ISSN 1346-9894

水研センター研報
Bull.Fish.Res.Agen.

水産総合研究センター
研究報告

26
平成20年12月

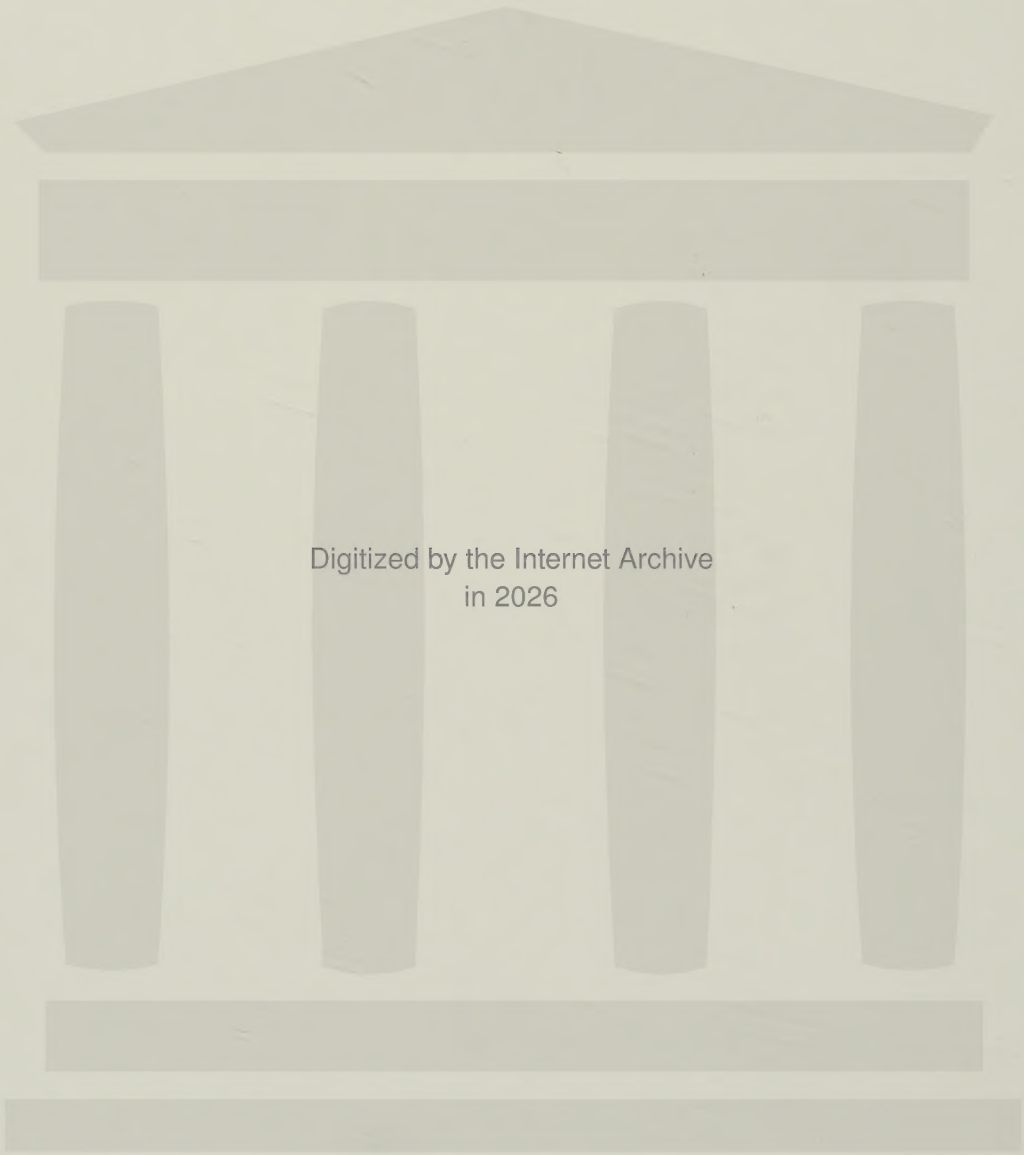
BULLETIN OF FISHERIES RESEARCH AGENCY

No.26
December 2008

FRA
Fisheries Research Agency

独立行政法人 水産総合研究センター
神奈川県横浜市
FISHERIES RESEARCH AGENCY
Yokohama, Kanagawa, Japan

Library
Pacific Islands Fisheries Science Center
2570 Dole St. Honolulu, HI 96822-2396



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/bulletin-japan-fisheries-research-education-agency_2008-12_26

水産総合研究センター研究報告

第26号　　平成20年12月

目　　次

序　　章

（発生サブチーム）

脊椎骨異常解決を目指した体節分節機構の解明
荒木和男・岡本裕之 …… 1

結合振動系としての分節時計－ゼブラフィッシュを用いた解析
武田洋幸 …… 9

魚類細胞および胚におけるストレス誘導性アポトーシスの分子メカニズム：
中性スフィンゴミエリナーゼ-セラミド経路の活性化
藪　健史・山下倫明 …… 15

魚類細胞におけるストレスによって誘発されるオートファジーの観察
藪　健史・山下倫明 …… 23

魚類の胚発生におけるオートファジーが関与する卵黄吸収機構
今村伸太朗・藪健史・山下倫明 …… 29

魚類のストレス応答を制御する熱ショック転写因子
尾島信彦・山下倫明 …… 35

トラフグ RALDH2 のクローニング
－魚類ビタミン A の胚発生での役割解明に向けて－
宇治　督・鈴木　徹・黒川忠英 …… 41

（形質サブチーム）

魚類の初期発生期におけるサイトカイン遺伝子群の機能を探る
吉浦康寿・伊藤かな子・乙竹　充 …… 47

魚類の食欲を制御する分子機構を探る
～フグゲノム情報を利用した leptin および agouti の同定～
黒川忠英 …… 53

魚類における体脂肪蓄積機構の解明
奥　宏海 …… 63

魚肉軟化機構の解明と遺伝子導入技術を用いた肉質改善技術の開発
豊原治彦 ……69

貝類インスリン関連ペプチドの生理機能
淡路雅彦・森山俊介……77

ゲノムデータベースを利用したトラフグ優良形質遺伝子の探索
渡部終五・木下滋晴・池田大介・古川聡史・鈴木譲・菊池潔・甲斐　渉……83
（生殖サブチーム）
魚類における卵黄の蓄積・分解・利用機構の解明
松原孝博・大久保信幸・澤口小有美・玄浩一郎 ……91

生殖細胞移植を用いた魚類遺伝子資源保存法の開発
吉崎悟朗 ……99

魚類の生殖腺性分化機構研究の現状
小林　亨 ……107
性ステロイドホルモンによる精子形成および初期卵形成の制御機構
三浦　猛 ……115

魚類における雄性ホルモンの産生ならびに受容機構
玄　浩一郎・奥　宏海・松原　孝博 ……123

ウニ生殖巣の分化と成熟の過程を探る
山野恵祐・東藤　孝・浦和寛 ……129

クルマエビ卵巣のビテロジェニン遺伝子発現調節に働く
細胞内シグナル伝達系の解明
奥村卓二 ……135

独立行政法人水産総合研究センター交付金プロジェクト
「形態・生理機能の改変による新農林水産生物の創出に関する総合研究」
水産生物サブチーム

序　　章

人工生産種苗にみられる色素や骨格などの形態異常の多発が，種苗生産現場での大きな問題の一つとなっている。これまで形態異常の問題に関して，ビタミンや不飽和脂肪酸などの栄養学的な観点からのアプローチがなされてきたが，十分な問題解決には至っていないのが現状である。これまで，異常を引き起こしている色素や骨格そのものの器官形成や組織分化の制御機構に関する研究がなされておらず，このような観点からのアプローチは問題解決のブレークスルーになることが期待される。また，消費者のニーズの多様化に伴って、様々な種の養殖が行われるようになり，より一層養殖対象魚種の種苗を安定的に供給するシステムの開発が求められている。このため、種苗のもととなる配偶子（卵や精子）のできるメカニズムを理解し，それを利用した人為制御による種苗生産技術の開発が必要となっている。さらに，近年需要が高まっているウニ，ナマコ等の海産無脊椎動物では，魚類と比較してそれらの配偶子形成機構に関する研究はほとんど行われていない。これらのことから，魚介類生殖の諸過程における生命現象および制御機構に関して分子レベルで理解を深め，合理的な種苗生産技術の開発に資する必要がある。

「形態・生理機能の改変による新農林水産生物の創出に関する総合研究」は，平成１０年から農林水産技術会議主導の大型別枠研究として開始された。本プロジェクト全体の基本理念は，生物の持つ固有の形態や生理機能を遺伝子・分子レベルで解析し，そのメカニズムに基づいた生物の形態・生理機能の改変技術などを開発することにより農林水産業の発展に資することであり，農林水産省傘下の研究所横断的に「光合成・環境チーム」「植物形態チーム」「畜産チーム」「水産生物チーム」「昆虫チーム」「微生物チーム」「共通基盤チーム」の７つのチームから構成されていた。平成16年度からは水産生物チーム単独で水産総合研究センターの交付金によるプロジェクト研究として実施されてきたものである。

このような背景のもと，水産生物チームでは，発生・形質・生殖の３つのサブチームを設け本プロジェクトを推進し前述の課題に取り組んできた。本書は平成16年度から19年度に実施したプロジェクト研究第３期の成果をとりまとめたものである。本プロジェクトの基本理念に基づき得られた基礎的・基盤的な成果は，将来の水産技術開発の核となると期待できるものである。これらの成果が広く活用され，水産分野における諸問題の解決に資することとなれば幸いである。

平成20年4月

養殖研究所所長　中野　広

水研センター研報，第26号，1－8，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 1－8，2008

報　文

脊椎骨異常解決を目指した体節分節機構の解明

荒木和男*・岡本裕之*

Study of somite segmentation mechanism to determin abnormal spinal column development

Kazuo ARAKI and Hiroyuki OKAMOTO

Abstract In the nursery production field, the frequent occurrence of abnormal spinal cord development and curved bodies in fishflies is a big problem. In fish, osteoblasts are bone cells from the sclerotome derived from a somite and they form into sclerofragments and attach to the notochord to form the spinal cord. The analysis of the phenotypes of zebrafish and medaka mutants having irregular somite development showed that irregular somite generation and segmentation induces irregular spinal cord development. However, the mechanism underlying somite segmentation has not been clarified. In this paper, we report our recent study about the detection and functional analysis of genes that control somite segmentation.

Key words : Somite, spinal column, segmentation, mutant

種苗生産の現場では、中胚葉由来の脊椎の湾曲による形態異常の発生が大きな問題の１つになっている。頭骨を除く骨や骨格筋は、初期胚期に形成される中胚葉組織の体節から形成される硬節由来の骨形成細胞が脊索の周りに硬骨を貼り付けてゆくことによって脊椎がつくられることが知られている。また、これまでの体節形成異常を示すゼブラフィッシュやメダカの突然変異体の表現型の解析から、体節の形成異常特に分節異常は著し脊椎骨の形成異常を生ずることが知られている。しかし、体節の分節機構についてはすべてが明らかにされている訳ではない。そこで、本報では体節の分節化を制御する新規の遺伝子の同定と機能の解析について、我々の最近の研究を紹介する。

ハタやクエ、ブリをはじめとする種苗生産の現場では１部の脊椎骨の形の異常が原因で体が湾曲する稚魚が多く出現する場合があり、大きな問題になっている。マハタの観察から発生の早い時期から体の湾曲が観察されることから（Nagasaki et.al 2006）、エサの成分やウイルスの感染によるとは考えにくく未だに原因は分かっていない。

魚類では、体節の後半部に形成される硬節で骨形成細胞が生まれ、脊索のまわりに硬骨の断片を貼り付けて行くことによって脊椎骨が作られる（Kii et.al. 2004、Fleming et.al. 2003）。そのため、脊椎骨や脊椎骨から生える神経棘や血管棘の形や配列のパターンは体節の分節のパターンに強く依存している（Fisher et.al.2003）。よって、体節の形成機構を明らかにすることによって、養殖対象種の脊椎骨異常の原因を探る手がかりが得られると考えられる。

魚類初期中期嚢胚期の胚で中胚葉の誘導が起こり、体軸が形成された後、頭部と尾部にオルガナイザー領域が形成され、体節は胴尾部オルガナイザー領域から形成される中胚葉組織から一定時間に１個ずつ付け加えられるような形で形成されて行く。体節が一定時間毎に形成されるクロック機構については多くのことが明らかにされつつあるが（Julich et.al. 2000, Horikawa et.al. 2006）、分節の機構についてはすべてが明らかにされている分けではない。そこで、我々は、分節に関連する新たな遺伝子を同定し、機能を解析することを目的に、胴尾部オルガナイザー領域で特異的に発現

2008年４月23日受理　(Received on April 23,2008)
*養殖研究所　〒516-0193　三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1 (National Research Institute of Aquaculture, Nakatsuhamaura, Minami-Ise, Mie 516-0193, Japan)

する新規の遺伝子（特に *T-box*, *forkhead* 領域を持つ遺伝子）の単離を試み、得られた *tbx24* が体節の分節化を制禦していることを明らかにした（Nikaido et.al. 2002）。

胴尾部オルガナイザイー領域で発現する遺伝子の単離

ゼブラフィッシュ及びメダカの胴尾部オルガナイザー領域で発現している *T-box* 遺伝子及び、*forkhead* gene family の遺伝子を単離することを目的に、これまでに報告されている魚類の *T-box*, *forkhead* domain の共通配列をもとにプライマーを設計し、PCR によりこれらの領域の DNA 断片の増幅を行った。次に、500 個体の胴尾部領域を集めて RNA の抽出を行い、cDNA ライブラリーを作成し、得られた DNA 断片をプローブに用いて新規の *T-box* 遺伝子及び、*forkhead* gene family の遺伝子のクローニングを試みた。得られた *T-box* 遺伝子の 1 つは、これまでに報告されている *T-box* 遺伝子とは構造が異なる新規の遺伝子であり、中胚葉誘導後、胚円周辺部で発現し、胴尾部が形成された後、体節の形成が終わるまで尾部末端部で発現する遺伝子であった（Figure 1 参照）。本遺伝子は 24 番目に発見された *T-box* 遺伝子であるため、*tbx24* と命名された。

tbx24 遺伝子の発現抑制と表現型の解析

tbx24 のアンチセンスモルフォリノオリゴを作成し、受精卵の胚胎にマイクロインジェクションをしてその後の発生を観察したところ、体節の分節化が起こらないことが分かった。体節形成期に未分節中胚葉領域で発現様式の振動を起こす *her1* 遺伝子の発現を見たところ、発現様式の異常を起こしていることが分かった。また、筋節で特異的に発現する *myod* の発現を見たところ、筋節毎のバンド状の発現は見られず、体節形成領域での一様の発現が観察された。これらの表現型は、すでに報告されていたゼブラフィッシュの突然変異体 *fss* に極めて類似するものであった（Figure 2 参照）。

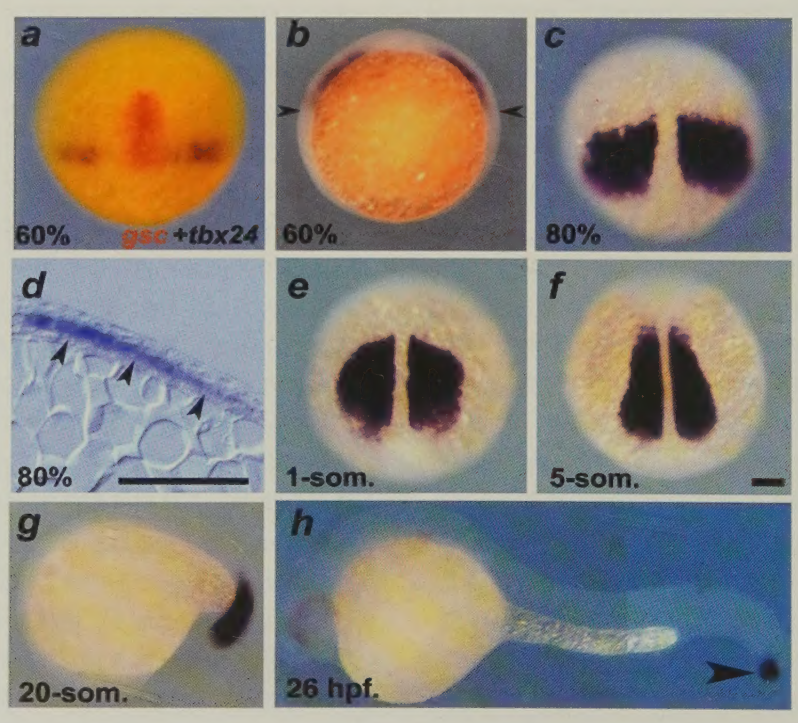


Fig. 1. The gene *tbx24* is expressed in the presomitic mesoderm (PSM). a, b: Dorsal (a) and ventral (b) views of embryos at 60% epiboly stage. No signals are detected in the ventral region (below the arrowheads in b). The red signal indicates the expression of *gsc*. c–f: Dorsal views of the embryos at 80% epiboly stage (c), one-somite stage (e), and five-somite stage (f). A transverese section (d) at 80% epiboly stage shows that transcripts of *tbx24* are localized under below mesodermal cells (arrowheads). g, h, Lateral views of embryos at the 20-somite stage (g) and 26 h postfertilization (hpf, h). The arrowhead in h indicates the residual signal of *tbx24* transcripts. Images in a, c, e, f, anterior to the top; in b, d, dorsal to the top; in g, h, Anterior to the left. Scale bars, 100 μ m

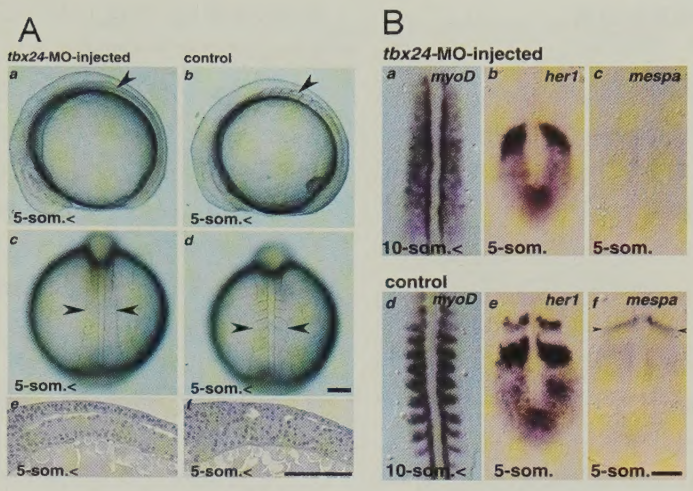


Fig. 2. Abrogation of the *tbx24* function inhibits somite segmentation. A: Injection of *tbx24* morpholino inhibits segmentation of PSM. The external morphology is shown in **a**–**d**. All embryos reached at least the five-somite stage. Arrowheads indicate the positions of the unsegmented paraxial mesoderm (**a**, **c**) or somites (**b**, **d**). Panels **a** and **b** show views of the left side. c and d show the dorsal view. The anterior is oriented to the top. **e**, **f**, Parasagittal sections, at the paraxial mesoderm level, of embryos injected with *tbx24* morpholino (**e**) and control embryos (**f**) at segmentation stage. The anterior is oriented to the left. B; Injection of tbx24 morpholino caused loss of segmented expression of *myoD* (compare **a** with **d**), a premature termination of her1 expression (**b**, **e**) and loss of mespa expression in PSM (**c**, **f**). Flat-mounted embryos are shown, and the anterior is oriented to the left. Scale bars, 100 μ m.

tbx24 の連鎖解析と fss のレスキュー実験

tbx24 が *fss* の変異遺伝子である可能性を探るために、どの遺伝子座にマッピングされるか、連鎖解析を行った。その結果、*tbx24* 遺伝子は *fss* と同じ遺伝子座にマッピングされた。そこで、*fss* の *tbx24* ゲノム遺伝子を単離し、その配列を解析したところ、片方のアレルでは1塩基の欠損が、もう一方のアレルでは2塩基の置換が起こっており、共に断片的なタンパク質しか作られないことが分かった。そこで、*fss* の受精卵に *tbx24* のゲノム遺伝子を注入してレスキュー実験を行ったところ、体節の分節が起こるようになった。また、*myod* 及び *fgf8* の発現を見たところ、正常に近い発現が見られた（Figure 3 参照）。以上のことから *tbx24* は *fss* の変異遺伝にであることが明らかになった。

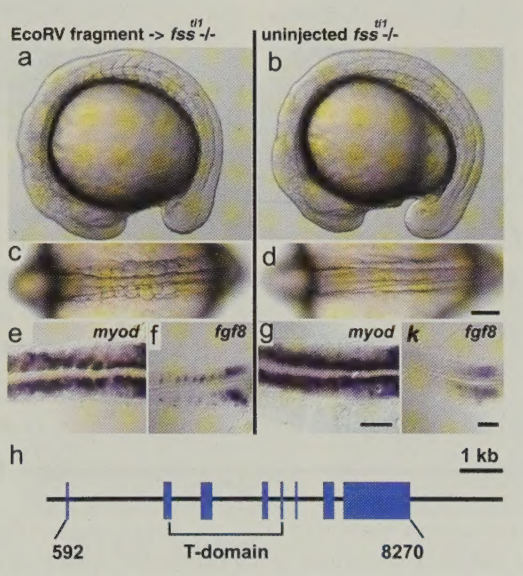


Fig. 3. *tbx24* can rescue fss phenotype. The *EcoRI* fragment containing *tbx24* can rescue the fss phenotype at the morphological (compare **a**, **c** with **b**, **d**) and molecular levels (**e**–**k**). The segmented expression patterns of *myoD* and *fgf8* are partially rescued (**e** and **f**, respectively), but they are lost in the mutant embryos (**g** and **k**, respectively). **h**, Distribution of the open reading frames encoding Tbx24 in the *EcoRV* fragment. Panels **a** and **b** show the left-side view, anterior to the left; **c** and d show the dorsal view, anterior to the left; **e**–**k** show flat-mounted embryos, anterior to the left. Scale bars, 100 μ m.

tbx24 による分節制御機構

未分節中胚葉領域で幅広く発現する *tbx24* が、どの様に体節の分節を制御しているかは極めて興味が持たれるところである。*tbx24* と未分節中胚葉で発現移動を起こす *her1* 及び、分節を制御する核タンパク質の *mespa* の発現様式の比較を行った。その結果、*her1* と *mespa* の最も前方の発現は、*tbx24* の未分節中胚葉領域における発現の前方領域に一致していた（Figure 4 参照）。このことによって、*tbx24* が *her1* と *mespa* の前方領域における発現を制御することによって、分節を制御している可能性が考えられた。次に、*tbx24* の発現領域の近くで *fgf8* が発現していること、*fgf8* によっても体節の分節が制御されていることから、*tbx24* が *fgf8* による発現制御を受けている可能性が考えられる。そこで、*fgf8* を浸透させたビーズを *tbx24* の前方発現限界領域に移植したところ、*tbx24* の発現が前方まで発現するようになることを観察した。次に、*fgf8* の化学アンタゴニストである SU-5402 で処理したところ、*fgf8* 及び *tbx24* の発現共に発現抑制されていることが観察された（Figure 5 参照）。このことは、*fgf8* によって *tbx24* の発現が制御されていることを示唆する。そこで、*fgf8* の突然変異体である *ace* における *tbx24* の発現を見た。その結果、8 体節期までは *tbx24* の発現はみられたが、その後は *tbx24* の発現が見られなくなった（Figure 6）。これまでの研究から、8 体節期までの初期胚では、胴尾部オルガナイザー領域で *fgf8* と同時に *fgf24* も発現していることが知られている。そのため、*ace* の初期胚においては *tbx24* は *fgf24* によって発現が誘導され、その後は *fgf8* によって発現が誘導される可能性が示唆される。

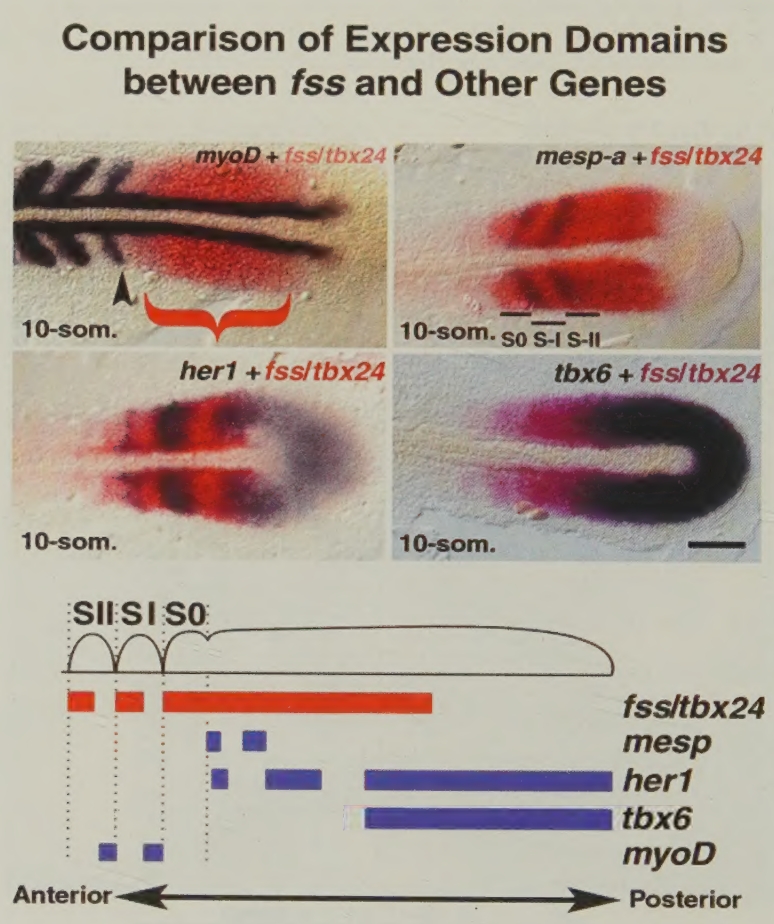


Fig. 4. Comparison of expression pattern between *tbx24* and other genes expressed on PSM. The gene *tbx24* is expressed in maturing PSM cells (a–d) . Comparison of the expression domain of *tbx24* (red) with those of *myod* (a), *mespa* (b), *her1* (c), and *tbx6* (d). The expression domains of mespa (b) and anterior stripes of *her1* expression (c), which are depend on Fss function, reside within the *tbx24* expression domain. Flat-mounted samples (a–e) are shown; the anterior is oriented to the left. 5 represents the forming somite. e, Schematic illustration showing the expression pattern of genes examined above. Scale bars, 100 μ m

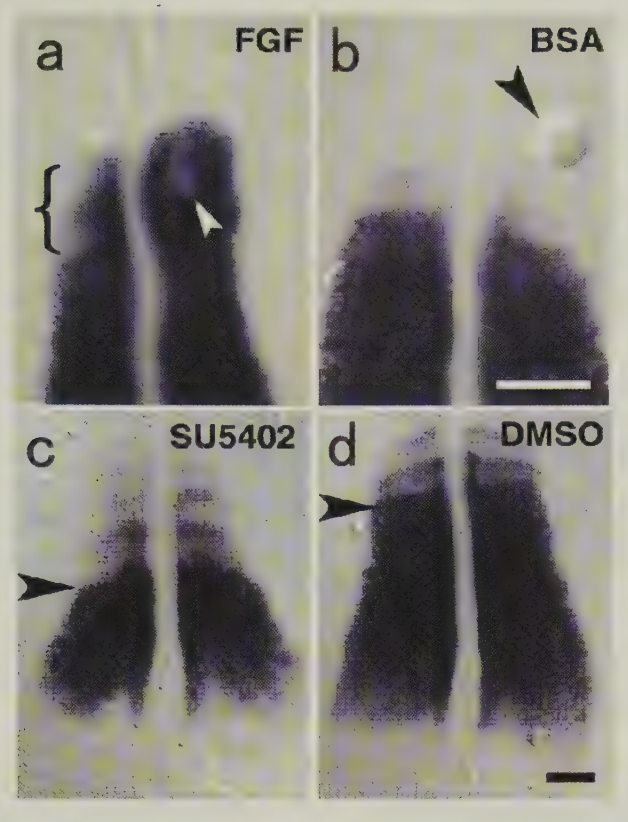


Fig. 5. *tbx24* is positively regulated by FGF signaling. The bases, incubated with FGF8 and BSA, were buried in the PSM of a zebrafish embryo at the one-somite stage. These embryos reachrd the five-somite stage and their *tbx24* expressions was analyzed. **a**, the expression domain of *tbx24* extended in an anterior orientation with respect to FGF. The white arrow head indicates the buried base incubated with FGF. **b**, BSS did not have an effect on the expression domain of *tbx24*. Arrow head shows the buried base incubated with BSA. **c**, **d**.: Pre-somitogenic stage zebrafish embryos were treated with SU5402, an FGF signal inhibitor, or DMSO, and developed to the five-somite stage. **c**, SU5402 inhibited tbx24 expression. **d**, DMSO did not affect the expression domain of *tbx24*. The arrow head shows the anteriormost expression of tbx24 in PSM. The anterior is oriented to the top. Scale bar, 50 μ m

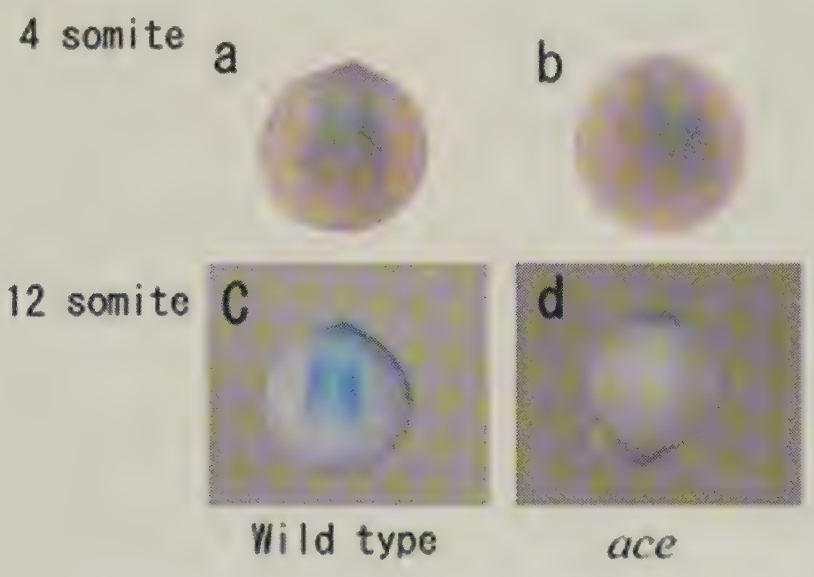


Fig. 6. Expression of *tbx24* in *ace* mutant embryos. a, c; *tbx24* expression domain in wildtype embryos at four-somite stage (**a**) and 12- somite stage (**c**) . **b**, **d**; *tbx24* expression domain in *ace* mutant embryos at four-somite stage (**b**) and 12-somite stage (**d**) . *ace* mutant embryos produced only anterior eight somites. After the eight-somite stage, ace mutant embryos expressed tbx24 very weakly. The anterior is oriented to the top

tbx24 の下流にくる遺伝子の同定

tbx24 の遺伝子の下流に来る遺伝子を同定するため、*fss* と AB ラインのゼブラフィッシュの体節形成期の胚よりタンパク質の抽出を行い、2 次元電気泳動により発現に差の見られるタンパク質の同定を試みた（Figure 7）。その結果、発現に差が見られるいくつかのタンパク質が同定された。その一つのタンパク質の断片化を行いイオン化質量分析計を用いて、アミノ酸配列の解析を行った。そのアミノ酸配列を基に DNA 配列を想定し、これらの配列をゼブラフィッシュのゲノム配列上に貼り付けてゆくことによって、1 カ所に貼り付けられる可能性を検討した。その結果、第 12 連鎖群上の 1 カ所に多くの配列が張り付くことが分かった。そこで、その配列をもとにプライマーを設計し、体節形成期の胚の mRNA から合成した cDNA をもとに PCR 反応を行い、尾部末端で発現する 2 つの遺伝子を得ることが出来た。その配列から 1 つはニワトリの IL4 と最も相同性のある遺伝子であった。そこで、RT-PCR により発現している時期及び発現している組織の同定を行った。その結果、この遺伝子は初期においては体節形成期に作られた直後の体節の後方部で発現すること、*tbx24* の突然変異体である *fss* の胚では発現しないこと、また、成魚においては筋肉で発現していることが明らかになった（Figure 8 参照）。IL4 に配列が似ているにも関わらず、脾臓などリンパ球が分化する組織での発現が見られなかったため LPS をゼブラフィッシュの成魚に注射し、一定時間毎に脾臓を取り出して発現を調べたが、発現が誘導されることはなかった。

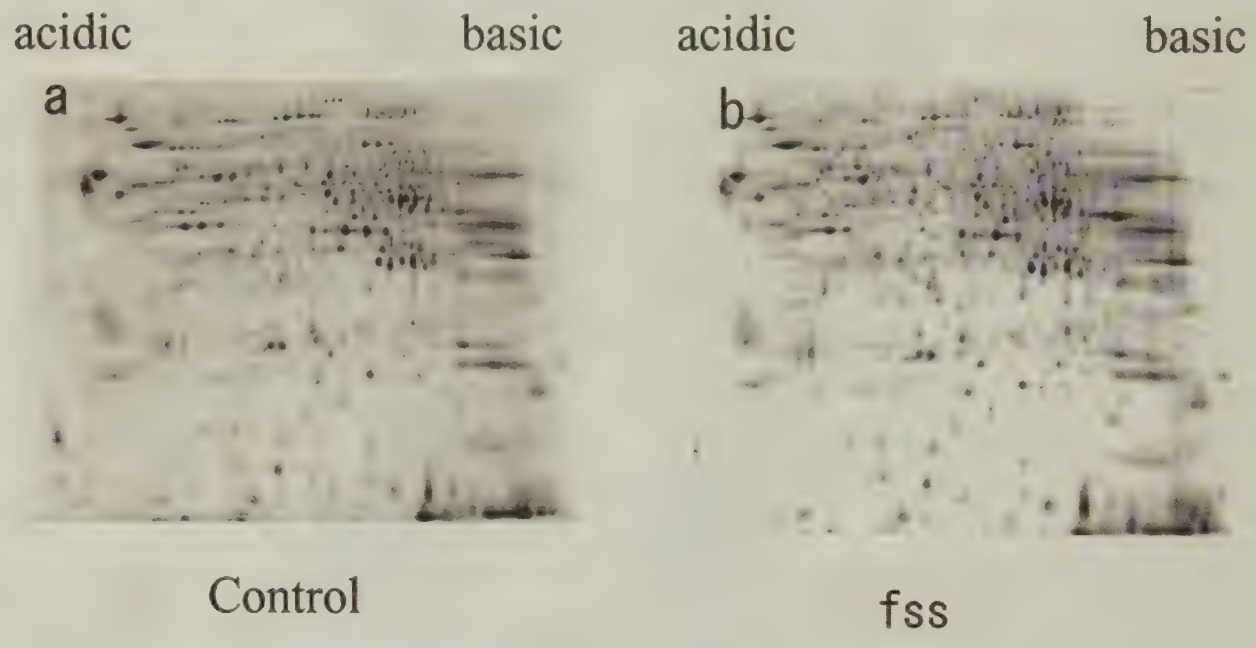


Fig. 7. Two-dimentional electrophoresis of extracts of somite-stage embryos. We examined the extracts of control (a) and fss mutant (b) embryos at the somite generation stage by two-dimentional electrophoresis.

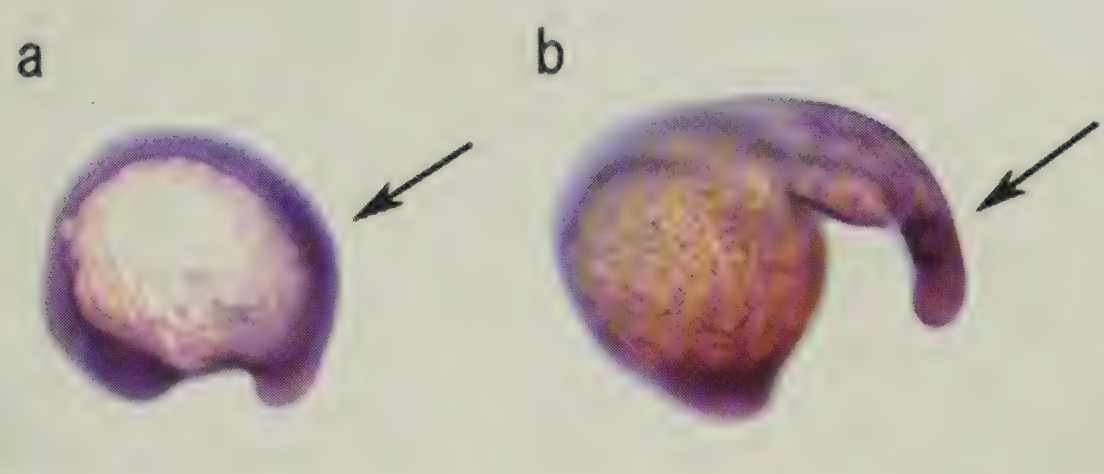


Fig. 8. Expression pattern of IL4-like protein 6. The IL4-like protein 6 gene was expressed in the anterior region of each somite before the eight-somite stage (**a**) . After that, the IL4-like protein 6 gene was expressed in two posteriormost somites (**b**) . The arrows indicate the expression of the IL4-like protein 6 gene.

おわりに

我々は、尾部特異的に発現する遺伝子の単離から新規の *T-box* 遺伝子である *tbx24* を得た。本遺伝子は中胚葉誘導後に胚円周部で発現を開始し、体節形成が終わるまで尾部末端で発現する遺伝子で、体節の分節を起こさないゼブラフィッシュの突然変異体 *fss* の変異遺伝子であった。*tbx24* の発現を抑制すると *her1* や *myod* の発現様式が影響を受け、*mespa* の未分節中胚葉領域の前方部での発現が抑制されることから、これらの遺伝子の発現制御を通じて体節の分節化に関与すると考えられる。また、*fgf8* 遺伝子の異所的発現や発現抑制によって *tbx24* の発現がそれに応じて異所的発現を行ったり、発現抑制されること、*fgf8* の突然変異体である *ace* では8体節形成後に *tbx24* が発現していないことから *tbx24* は *fgf8* によって発現誘導すると考えられる。また、タンパク質の発現解析から *tbx24* の下流に IL4 様遺伝子が発現することを同定した。

今後、*tbx24* の下流に来ると考えられる IL4 様遺伝子と体節形成との関係を調べる必要がある。また、*tbx24* の下流に来るより多くの遺伝子の同定を行い、どの様な分子機構で *tbx24* が体節の分節を誘導するのかを解明してゆく予定である。

文　献

Fisher S., Jagadeeswaran, P. and Halpern M.E. 2003: Radiographic analysis of zebrafish skeletal defect. Dev. Biol., **264**, 64-76.

Fleming A., Keynes R. and Tannahill D. 2003: A central role for the notochord in vertebral patterning. *Development* , **131**, 873-880.

Horikawa K, Ishimatsu K, Yoshimoto E, Kondo S, and Takeda H. 2006: Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock. *Nature*, **8**, 441, 719-723.

Julich D, Hwee Lim C., Round J., Nicolaije C., Schroeder J., Davies A., Geisler R., Lewis J., Jiang Y.J. and Holley S.A., 2005: Tubingen 2000 Screen Consortium Beamter/deltaC and the role of Notch ligands in the zebrafish somite segmentation, hindbrain neurogenesis and hypochord differentiation. Dev Biol, 15, **286**, 391-404.

Kii I., Amizuka N., Shimomura J., Saga Y. and Kudo A., 2004: Cell-cell interraction by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cell into the cells of the osteo-lineage and the chondro-lieanage. *J. Bone Miner Res.* **19**, 1840-1849.

Mattey D.L., Dawes P.T., Nixon N.B. and Slater H., 1997: Transforming growth factor beta 1 and interleukin 4 induced alpha smooth muscle actin expression and myofibroblast-like differentiation in human synovial fibroblasts in vitro: modulation by basic fibroblast growth factor. *Ann Rheum Dis*. **56**, 426-31 (1997) .

Nagano, N., Hozawa A., Fujii W., Yamada T., Miyake K., Sakakura Y. and Hagiwara A., 2007: Sketal development and deformities in cultured laval and juvenile seven-bond grouper, *Epinephelus*

septemfasciatus (Thunberg) . *Aquac. Re.*, **38**, 121–13.

Nikaido, M., Kawakami, A.., Sawada, A., Furutani-Seiki, M., Takeda H. and Araki K., 2002: Tbx24, encoding a T-box protein, is mutated in the zebrafish somite-segmentation mutant fused somites. *Nat. Genet.*, **31**, 1995-199.

水研センター研報，第26号，9－14，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26, 9－14, 2008

報　文

結合振動系としての分節時計－ゼブラフィッシュを用いた解析

武田洋幸*

The 'coupled-oscillators' in the zebrafish segmentation clock

Hiroyuki Takeda

Abstract The most unique feature of vertebrate segmentation is its strict periodicity which is governed by the segmentation clock consisting of numerous cellular oscillators. These cellular oscillators, driven by a negative-feedback loop of Hairy transcription factor, are linked through Notch-dependent intercellular coupling and display the synchronous expression of clock genes. Combining our transplantation experiments in zebrafish with mathematical simulation, we have examined how the cellular oscillators maintain the synchrony and how they form a robust system against developmental noise such as stochastic gene expression and active cell-proliferation. Accumulated data demonstrated that the segmentation clock behaves as a 'coupled oscillators', a mechanism that is used for a synchronous flashing of fireflies.

Key words : somitogenesis, zebrafish, oscillators, clock, Notch

脊椎骨のような繰り返し構造の創出過程では、リズムを空間的パターンに変換する機構が存在する。私たちはその代表例として体節形成に注目している。体節は発生過程で一時的に見られる構造だが（Fig. 1a）、脊椎骨や肋骨など体節由来の組織のみならず、脊髄神経や血管など、他の器官の分節的構造の分節性を規定している。複雑なメカニズムのため、自然の状態や養殖の現場でも分節性がおかしくなった奇形や突然変異は多く見かける。背骨が融合したり、湾曲した魚である。

体節は、中胚葉性の細胞が体の後端にある尾芽から生み出されると同時に、前方に押し出され、ある一定の時間（マウスでは120分）毎に、一定の（空間的）間隔で頭部側からくびれ切れていくことで順次形成される。このように時を刻むように正確に進んでいく体節形成は、時計のような機構、即ち分節時計が必須である。そして、近年その存在と分子メカニズムが明らかとなってきた。分節時計とは、未分節中胚葉（presomitic mesoderm, PSM）内に存在する小さな時計細胞の集合体である。個々の時計細胞内では、いくつかの遺伝子が一定のリズムで発現のON/OFFを繰り返す。最近の研究により、分節時計を構成する遺伝子群（構成要素）は、転写因子ヘアリ（Hairy）を中心とするノッチ（Notch）シグナル関連遺伝子であることが判明している。さらにそれぞれの遺伝子に変異を起こした個体では、分節時計が正常に機能しないことも示されている（Rida et al., 2004）。しかし、このような遺伝学的、分子生物学的な手法では解明できない重要な問題が残されている。それは、固有に振動する時計細胞を集団内でどのように同調しているか、また生体内で生じるノイズをどのように軽減して正確に時を刻み続けるか、という分節時計の作動原理とも言える問題である。我々は、ゼブラフィッシュ胚において改変した細胞を正常な胚へ移植すること、そしてその結果をシミュレーションで検証することでこの問題に取り組んだ。

2008年4月23日受理　(Received on April 23, 2008)
* 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻動物学大講座動物発生学研究室 113-0033 文京区本郷 7-3-1
(Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of TokyoHongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033 Japan)

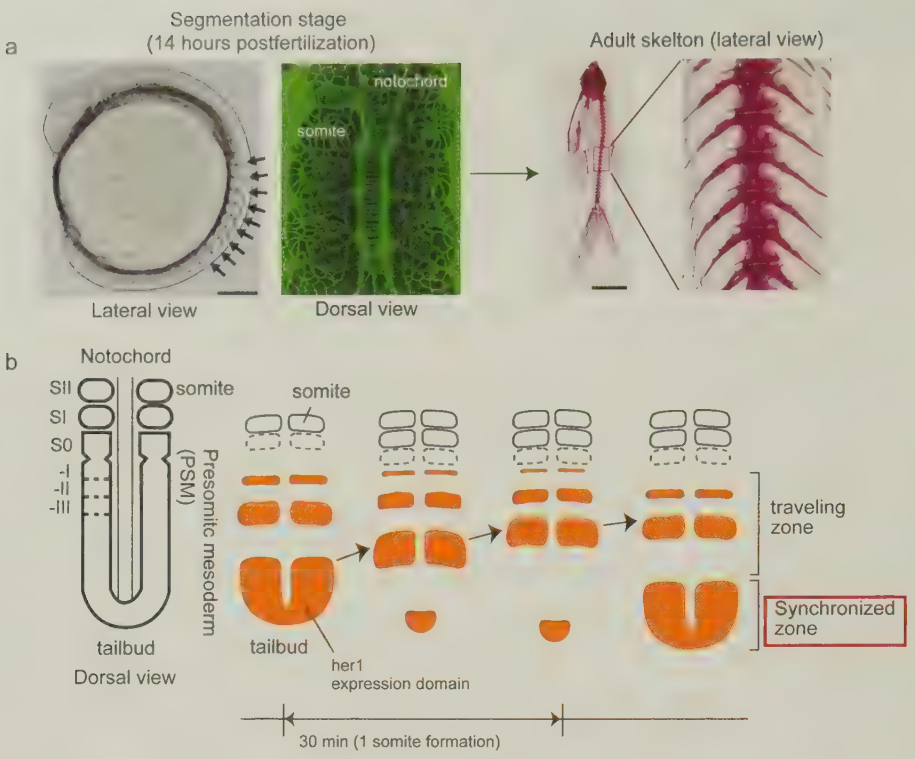


Fig. 1. Somitogenesis and segmentation clock in zebrafish

a, lateral and dorsal views of zebrafish embryos (left). Somites give rise to the repeated axial skeleton in adult.b, Schematic diagrams illustrating expression profile of the *her1* gene (orange) in the PSM.

分節時計の構成要素

分節を制御する時計遺伝子として最初に発見されたのが、1997年にニワトリで単離された *c-hairy*（ヘアリ）*-1* という bHLH 型転写因子である（Palmeirim et al., 1997）。この発見以降、時計関連遺伝子が次々に他の脊椎動物でも同定された。興味深いことに、それら多くがノッチシグナル関連因子であった。本研究の対象であるゼブラフィッシュ胚では、分節は30分に1回のペースで起こる。それに伴い、尾芽領域で30分に1回、ゼブラフィッシュのヘアリ遺伝子である *her1* の発現メインが現れる（Fig. 1b）（武田洋幸, 2002）（Holley and Takeda, 2002）。*her1* 発現領域は PSM の後半 1/4 程度を占めるが、その発現領域はその後、前後の幅が狭くなりながら前方に移動して、将来の分節位置で停止する。詳しい発現解析の結果、最初に発現が現れる PSM の後半 1/4 では、ほぼすべての PSM 細胞が同時に *her1* 発現の ON/OFF を繰り返す同調的振動を示し、一方その前方では、発現領域が移動波を形成し前方へ移動していることが判明した。

最近開発された高解像度 in situ hybridization 法で RNA の局在を同調振動ゾーンで観察すると、Fig. 2a のように、① *her1* mRNA 陰性、②核で転写開始（核でアレルに対応した2つの点状のシグナル）、③ mRNA が翻訳のために細胞質に移動、の3つの状態をほぼすべての細胞が同調的に繰り返していることが視覚的に明らかになった。我々はこの最も基本的な同調振動に注目しその同調メカニズムを以下で解析した。

ゼブラフィッシュの時計細胞（PSM 細胞）における振動機構について、遺伝学的解析により Fig.2b のようなモデルが提案されている。このモデルでは、他の脊椎動物同様にヘアリ遺伝子である *her1* のネガティブ・フィードバックループがコアとなり、さらにヘアリ転写因子はノッチ受容体のリガンドであるデルタ遺伝子（*delta*）の発現も抑制している。一方、PSM 細胞間はノッチ・デルタを介して共役している。これはかなり単純化しているモデルであるが（Lewis, 2003）、我々は名古屋大学・近藤滋研究室と共同で、10個から30個の PSM 細胞がノッチ・デルタを介してリニアーに結合したシミュレーターを作成し、同調振動ゾーンにおける同調的振動を再現することに成功した。このシシミュレーターを用いて、以下に述べる移植実験の検証およびシミュレーターの予測の in vivo での検証を行い、分節時計の作動原理を明らかにした。シミュレーターの詳しい記述は文献（Horikawa et al., 2006）の supplement を参照。

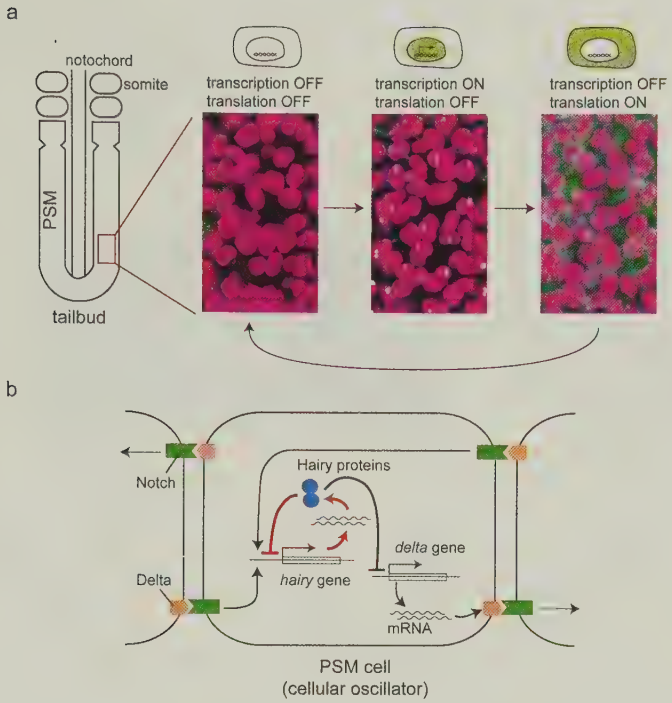


Fig. 2. Cellular oscillators in the zebrafish segmentation clock.

a, High resolution in situ hybridization detects subcellular localization of *her1* mRNA. The PSM cells display a cycle of no signal (left), nuclear dots (middle) and cytoplasmic signals (right). The posterior PSM exhibit synchronous oscillation.
b, The negative feedback-loop of Hairy lies at the core of the cellular oscillator.

デルタ強制発現細胞による分節時計の加速

仮に Fig. 2b のような機構が時 PSM 細胞の内外で働いているとすると、正常に時を刻んでいる分節時計内に少数のデルタ強制発現細胞を移植した場合、その影響が周囲の正常な細胞に及び、分節時計の位相に変化が見られるはずである。このような仮説を検証するために、Fig. 3a のような移植実験を行った。デルタ強制発現細胞は、ヘアリの翻訳をアンチセンスモルホリノオリゴヌクレオチド（MO）を注入して阻害した胚から得た。ヘアリはデルタ遺伝子の発現を抑制するので、ヘアリの機能を喪失した細胞では、デルタ遺伝子の発現が恒常的に上昇している。つまりこの細胞は、自分自身は振動せずに周囲の PSM 細胞に対してノッチ受容体を活性化するシグナルを恒常的に送っていると考えられる（Fig. 3b）。ドナー細胞であるデルタ強制発現細胞を宿主の胞胚（受精後 4 時間）の将来体節を形成する領域に移植し、観察は宿主胚が体節を形成する受精後 14 時間頃に行った。

移植結果は非常に興味深いものであった。Fig. 3c は、移植実験の結果の一例を示している。多くの場合（91/96）、ドナー細胞が存在する PSM で体節境界が対照側に比べて前方へシフトしていた。さらに分節境界のシフトは、移植側の PSM における *her1* の周期的発現が加速された結果であることが判明した。デルタを恒常的に発現するドナー細胞が正常に機能している分節時計を加速させたことは確かであるが、この結果は Fig. 2b のモデルが in vivo で機能していることの反映であろうか？このことを確かめるために、我々の分節時計シミュレーターにデルタを恒常的に発現する仮想的ドナー細胞を置く実験を in silico で行った。その結果、仮想的ドナー細胞に隣接する PSM 細胞で発現振動が加速されるのが観察された（Fig. 3d、e）。これは、まさに我々が移植実験で得た結果と同じであった。つまり、Fig. 2b のモデルを基にしたシミュレーターは、分節時計の正常な同調振動を再現するだけでなく、外からの刺激に対して反応する様子まで正確に予測できたのである。これらの結果より、分節時計では、ヘアリ転写因子自身のネガティブ・フィードバックループを振動子のコアとし、ヘアリの制御下で周期的に発現変動するデルタを介して周囲の細胞を同期していることが示された。これは、物理・化学の現象でよく見られる、いわゆる結合振動計（coupled oscillators）そのものであり、生物現象である分節時計が一般的な coupled oscillators としてふるまっていることは、我々にとって驚きであった。実はホタルの発光同期もこの原理が使われている。

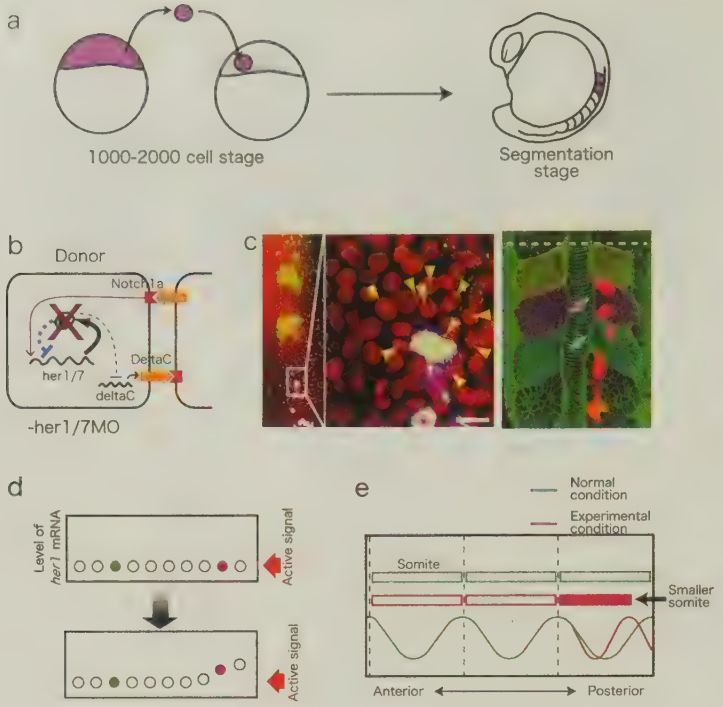


Fig. 3. Notch-dependent intercellular communication in the segmentation clock
a. Cell-transplantation assay at the blastula stage.
b. Donor cells that constitutively expresses DeltaC due to morpholino-knockdown of Her.
c. Effects of *her*-MO cells on transcription of *her1* (left) and segmentation points (right). The timing of *her1* transcription is locally advanced in the area near to the explants in the posterior PSM. Nuclei, *her1* mRNA and explants are stained in red, green, and blue, respectively. Arrowheads indicate nuclear-*her1*-cell, whose phase is advanced by the transplant. This effect results in a segment-shift phenotype. The segment positions are anteriorly shifted on the transplanted side (arrows). Donor cells are in red and the dashed line indicates the last normally formed segment border. Bar, 20 um.
d. 1-D simulation of oscillating PSM cells (dots). Snap shots of the calculated results in the 1st (up) and 10th-round of oscillation (down) are shown. Actively signaling cell is represented as red arrow. The active signal form the transplanted cell influences the adjacent cell to accelerate the oscillating phase (13.4% of oscillation phase after 500 min.). This effect is transmitted in succession, and results in the phase-shift of relatively distant cells, although the effect is still locally limited.
e. The smaller somite (red solid box) is formed by the accelerated oscillation (red line). The spatial pattern of clock oscillation (lines at the bottom) is translated according to the clock-and-wavefront mechanism.

分節時計内に存在するノイズと補正機構

生体内での遺伝子発現は化学反応を反映したものであり、従ってそれ自体 stochastic である。つまり、正確に時を刻む時計細胞であっても、遺伝子発現の ON/OFF のタイミングは微妙にずれているはずである。高解像度 in situ hybridization で *her1* 遺伝子の転写タイミングを細胞レベルで精査とすると、すべての細胞が同調していることが期待される同調振動ゾーンであっても、数％の非同期細胞が常に存在していることが判明した。さらに発生中の胚では、遺伝子発現のタイミングを狂わす大きな要因が存在する。それは高頻度の細胞分裂である。一般に分裂中の細胞核ではクロマチンが凝縮し、転写が抑制される傾向がある。実際ゼブラフィッシュ胚では、一回の分節期間 30 分の間に実に 10-15% の PSM 細胞が分裂を経験しており、このような高頻度の細胞分裂は分節時計に対してノイズとして大きな負荷を与えていた。

分節時計は生物が必然的に持つ様々なノイズを内包していることが判明した。それにもかかわらず、分節時計は長い期間正確に時を刻み続けなければならない。このことは分節時計内にノイズを効率よく軽減し、同調振動を維持する機構が存在していることを示唆している。ここで我々が注目したのが、同調機構でも登場したノッチ・デルタを介した共役である。ノイズとノッチ・デルタシグナルの関係を調べるために、in vivo での観察に基づいたノイズをシミュレーターに導入して、ノッチ・デルタによる共役が存在する条件

と非存在下で振動を行わせた（Fig. 4a）。すると、ノッチ・デルタを介した共役が存在すれば、一定のばらつき（ノイズ）を持った状態で定常的な同調振動が実現し、一方共役がない場合は、わずか数サイクルの振動で同調性が大きく損なわれることが判明した。前者は通常 in vivo で見られる同調振動の状態に酷似していた。シミュレーターによる後者の予測を in vivo で検証するために、我々は正常に発生している野生型胚をノッチシグナルの化学阻害剤 DAPT（ノッチ受容体のプロセシングに必須なγ－セクレターゼの阻害剤）で一過的に処理した。すると、同調振動ゾーンにおいても、その同調性が低下して、非同調的振動を示す細胞の割合が著しく増加した（Fig. 4b）。この結果は、ノッチ・デルタを介した共役機構が、生体内で発生するノイズを効果的に軽減し、分節時計の持続的な同調振動を可能にしていることを示している。

まとめ

今回の移植実験とシミュレーターを用いた一連の研究により、多数の振動子（時計細胞）で構成される分節時計がノッチ・デルタを介して同調とノイズ軽減を行っていること、そしていわゆる coupled oscillators としてふるまっていることを見出した。一個の受精卵に端を発する発生では、その過程で①細胞増殖により個体のサイズを増大、と②多くの遺伝子の秩序だった転写・翻訳、を両立させなくてはならない。しかし、細胞分裂は、遺伝子の発現に“ずれ”をもたらす最も大きな要因の一つとなるため、美しいパターンを作るための正確な遺伝子発現を実現することへの障害となっている。こうしたノイズの影響を、からだ作りの遺伝子プログラムが積極的に排除している様子を今回はじめて垣間見ることができたと考えている。本研究で明らかになったようなノイズの最小化機構は、ほとんどの遺伝子プログラムにもともと備わっていると考えられる。

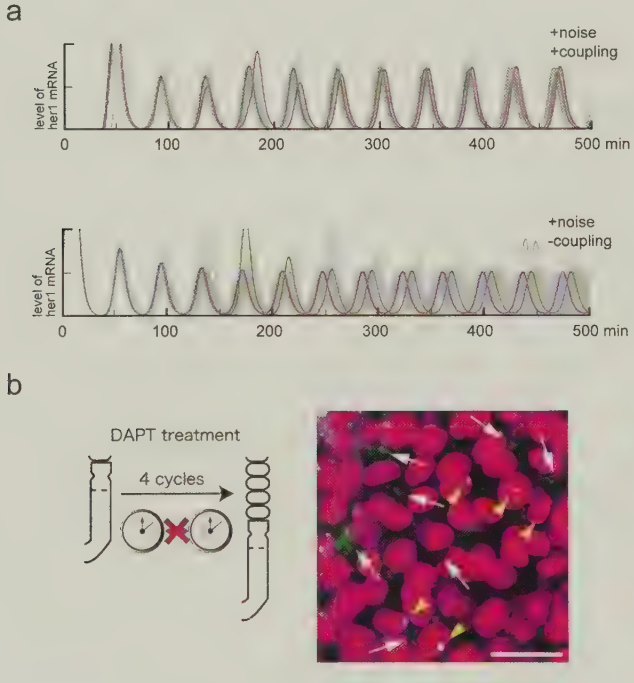


Fig. 4. Notch-dependent phase synchronization
a, in silico analysis. The noise condition observed in vivo is introduced. At time 0, all the cells in the array oscillate synchronously. Without the coupling (down), the phase of oscillation
soon becomes random. However, with coupling (up), the cell array can maintain the coherent oscillation. The traces of 10 cells are superimposed.
b, Disrupted synchrony in 10-somite-stage embryos transiently treated with DAPT for 2 hours. A great number of cells becomes out of phase, with delayed (arrows) and advanced (arrowheads) phase, in the synchronized zone of the posterior PSM (compare with 1d1-3 in the normal PSM).

謝　辞

本総説で紹介した研究は、当研究室のスタッフであった堀川一樹博士（現北海道大学）を中心に、名古屋大学・近藤滋博士の研究室との共同で行われた。また、大学院生である石松愛（東京大学）、吉元英一（名古屋大学）氏の本研究への多大な貢献に感謝します。

文　献

Holley, S. A. and Takeda, H., 2002: Catching a wave: the oscillator and wavefront that create the zebrafish somite. *Semin Cell. Dev. Biol.*, **13**, 481–418.

Horikawa, K., Ishimatsu, K., Yoshimoto, E., Kondo, S. and Takeda, H., 2006: Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock. *Nature*, **441**, 719–723.

Lewis, J., 2003: Autoinhibition with transcriptional delay: a simple mechanism for the zebrafish somitogenesis oscillator. *Curr. Biol.*, **13**, 1398–1408.

Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D. and Pourquie, O., 1997: Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell*, **91**, 639–648.

Rida, P. C., Le Minh, N. and Jiang, Y. J., 2004: A Notch feeling of somite segmentation and beyond. *Dev. Biol.*, **265**, 2–22.

武田洋幸, 2002: 波と分節．蛋白質核酸酵素, **47**, 2017–2023.

水研センター研報，第26号，15－21，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 15－21, 2008

報　文

魚類細胞および胚におけるストレス誘導性アポトーシスの分子メカニズム：中性スフィンゴミエリナーゼ-セラミド経路の活性化

藪　健史*・山下倫明*

The Molecular Mechanism of Stress-Induced Apoptosis in Fish Cells and Embryos : Activation of Neutral Sphingomyelinase-Ceramide Pathway

Takeshi YABU* and Michiaki YAMASHITA*

Abstract Mechanism of stress-induced apoptosis in fish cultured cells and embryos has been characterized to be regulated by Mg^{2+}-dependent neutral sphingomyelinase 1. The enzyme hydrolyzes sphingomyelin as a substrate and produces ceramide by its activation through various environmental stimuli, such as heat shock, UV irradiation, gamma-ray irradiation, and C_2-ceramide treatment. Such ceramide signaling activates a pro-apoptotic caspase cascade and apoptosis characterized by DNA fragmentation, and resulted in abnormal morphogenesis in fish embryogenesis. Therefore, ceramide signaling functions as the important pro-apoptotic signal in fish development and apoptosis.

Key words : apoptosis, heat shock, UV irradiation, gamma-ray irradiation, ceramide, neutral sphingomyelinase, caspase-3, zebrafish, embryo, Japanese flounder.

魚類の個体発生初期に起こる大量死は，天然海域における資源変動の要因として重要である。また，このような大量死は，種苗生産技術における大きな制約となっている。この初期減耗の主な要因として，環境条件，被捕食，疾病および飢餓の４つが考えられ，とくに受精卵期および仔魚期における生残には水温，日長などの環境要因が強く影響することが推定されている（Houde, 1987）。魚類の発生過程において，温度ストレスは，発生，成長，組織の分化および器官形成に障害をもたらすだけでなく，不妊化，性転換などの生殖生理の機能にも影響することが知られている（Strussmann et al., 1998; Ito *et al.*, 2003）。

ゼブラフィッシュの原腸胚を37℃で高温処理した時，体節数が減少するとともに，体節が萎縮した（Roy *et al.*, 1999）。このように，環境ストレスによる生物影響として，形態および組織観察，核酸比，消化酵素活性および代謝酵素活性が測定されている。その結果，天然資源の初期生活史の解析，生理状態の把握および種苗生産における健苗判定に対して，生化学的手法は，現在では重要な研究手段として認識されるようになった。

本研究では，環境ストレスによる生物影響を評価する手法を確立するため，受精卵およぶ仔魚に対してもたらされる環境ストレスによる障害とその度合いを解析する上で必要となる細胞死（アポトーシス）の分子メカニズムに着目した。そこで，この総説では，魚類のアポトーシスの発現および環境ストレスによるその誘導メカニズムを解説する。

アポトーシス

プログラム細胞死は，発生過程における形態形成

2008年４月23日受理　(Received on April 23, 2008)
* 中央水産研究所　236-8648　横浜市金沢区福浦 2-12-4 (National Research Institute of Fisheries Science, Fukuura, Kanazawa, Yokohama, 236-8648, Japan). National Research Institute of Fisheries Science
* Tel: 81-45-788-7665. Fax: 81-45-788 5001. E mail: mic@.affrc.go.jp

に伴って生じる細胞死をいう。アポトーシス研究は，Kerr らの細胞・組織の形態観察から始まり，その特徴的な細胞死はアポトーシスと呼ばれるようになった（Kerr *et al.*, 1972）。アポトーシスはその作用メカニズムが明らかにされることにより，現在ではプログラム細胞死とほぼ同義で用いられる。

魚類細胞でのアポトーシスシグナル伝達経路は，主に三つの経路に大別される。第 1 の経路は熱，紫外線，γ線や低酸素などのストレス誘導性の経路，第 2 は，Fas リガンド，骨形成因子（bone morphogenetic protein, BMP），腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor, TNF）などのシグナル分子の刺激によって誘導される膜レセプターを介する経路，変態に伴う甲状腺ホルモンによって誘導される経路が知られている。第 3 は，ベジクルの形成を伴う成長と飢餓に関わる経路である。これらの 3 経路のアポトーシスの分子メカニズムがゼブラフィッシュ，ヒラメ，ブリなどの培養細胞を使って解析された。ゼブラフィッシュ胚を熱ショック，紫外線またはγ線で処理すると，染色体 DNA の断片化が生じるので，Terminal deoxynuleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling（TUNEL）法を用いるホールマウント染色によってアポトーシスが生じた細胞の分布を観察した。その結果，多数の細胞が原腸胚期の被層で，体節の形成期から孵化期の脊髄，膜鰭，心臓および脳で観察された（Yabu *et al.*, 2001a）。また，ヒラメ胚への熱ショックあるいは紫外線処理によっても，心臓および膜鰭で著しいアポトーシスが観察された（Yabu *et al.*, 2003）。合成基質 Acetyl-DEVD-methylcoumarylamide（Ac-DEVD-MCA）を用いるカスパーゼ活性の測定によって，ストレス強度に対して依存的に活性が上昇した。これらのことから，熱，紫外線，γ線によって誘発されるアポトーシスはカスパーゼの活性化を介して生じることが推定された。

アポトーシス誘導分子カスパーゼ

魚類におけるアポトーシスの中心的役割を担う分子群として，カスパーゼファミリーが挙げられる。哺乳類ではカスパーゼファミリーは 14 種類のタイプから構成されるシステイン型プロテアーゼのファミリーである。ゼブラフィッシュには，9 種類のカスパーゼが存在する（Fig. 1）。これらのカスパーゼは，通常，細胞内では不活性前駆体として存在する。細胞がアポトーシス誘導の刺激を受け，カスパーゼが活性化すると，その活性により，細胞内の特定の基質タンパク質が加水分解され，アポトーシスが実行される。カスパーゼ

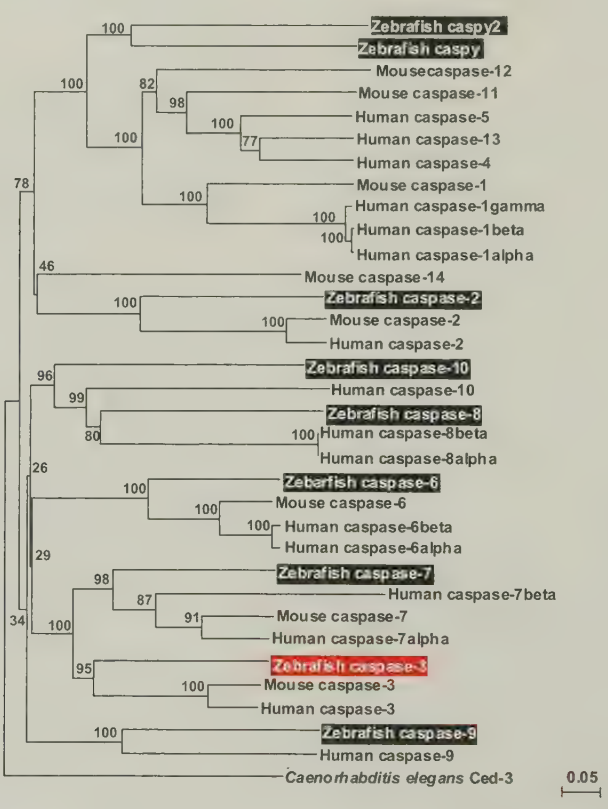


Fig. 1. Molecular phylogenetic tree of the caspase family in vertebrates. Caspy 1 and caspy 2 contain a pyrin domain in the N terminal region.

はその構造と機能からイニシェーター（始動）タイプ（カスパーゼ-8, -9, -10など）とエフェクター（実行）タイプ（カスパーゼ-3, -6, -7など）の2つのタイプに大別され，それらによるカスケード反応が誘導される。上流に位置するイニシェーターカスパーゼはアポトーシスシグナルを受け取ると自己活性化し，下流のエフェクターカスパーゼをプロセシングにより活性化させる。活性化したエフェクターカスパーゼによって各カスパーゼの基質としての切断点をもつ細胞構成成分が加水分解され，アポトーシス小体の形成，核の凝縮，染色体DNAの断片化，細胞膜の崩壊などのアポトーシス特有の細胞構造の崩壊と細胞形態の変化が引き起こされる。

カスパーゼ-3は，主要なエフェクターカスパーゼである。魚類細胞や魚類胚でアポトーシスの誘導能をもつカスパーゼ-3がクローン化された（Yabu *et al.*, 2001b）。ゼブラフィッシュカスパーゼ 3は282残基のアミノ酸からなり，不活性前駆体から活性化する際のプロセッシングを受ける切断点が2カ所推定された。大腸菌発現系による組み換えカスパーゼ-3，Ac-YAVD-MCA，Ac-LEHD-MCA，Ac-IETD-MCAを水解することができず，Ac-DEVD-MCAだけを特異的に水解した。また，カスパーゼ-3を魚類細胞およびゼブラフィッシュ胚へ過剰発現させた結果，アポトーシスが生じ，成熟酵素へのプロセッシングが観察された。このことから，本酵素がアポトーシスを実行する本質的な分子であることが明らかにされた（Yabu *et al.*, 2001b）。

スフィンゴ脂質

スフィンゴ脂質研究は，Thudichum（1884）が脳組織の抽出物中に未知の脂質として，セレブシド，スフィンゴミエリン，スフィンゴシンが発見したことに始まる。脳・神経系における生体膜脂質の構造解析およびスフィンゴリピドーシス（脂質蓄積症）の病態解明の二つを軸として研究が進展してきた。その後，スフィンゴ脂質は，生体膜の構成成分として細胞の構造を維持することおよび細胞内の栄養源としての役割を担うと考えられてきた。JonesとMichell（1975）は，ホルモンによる刺激によってイノシトールリン脂質が応答して，細胞内カルシウムが増加するという脂質の新たな機能を提起した。以後，生体膜の研究だけでなく，細胞内シグナル伝達物質としての脂質の役割が重要視されている。Okazakiら（1989）は，セラミドが細胞分化の誘導時にシグナル伝達物質として働くことを見出した。それ以来，セラミドおよびスフィンゴシン1-リン酸は，細胞内シグナル伝達物質として，分化，アポトーシス，細胞増殖などの細胞機能を制御すると考えられている。

スフィンゴ脂質は，頭は人で胴体は獅子であるスフィンクスに分子構造を例えて，非水溶性の脂肪酸と水溶性のアミノ酸から構成されるスフィンゴ脂質の化学構造に対して名付けられた（Fig. 2）。すなわち，スフィンゴ脂質はセラミドまたはスフィンゴシンを基本骨格とする。セラミドの合成系・代謝系として4経路が知られている（Fig. 3）。すなわち，セリンとパルミ

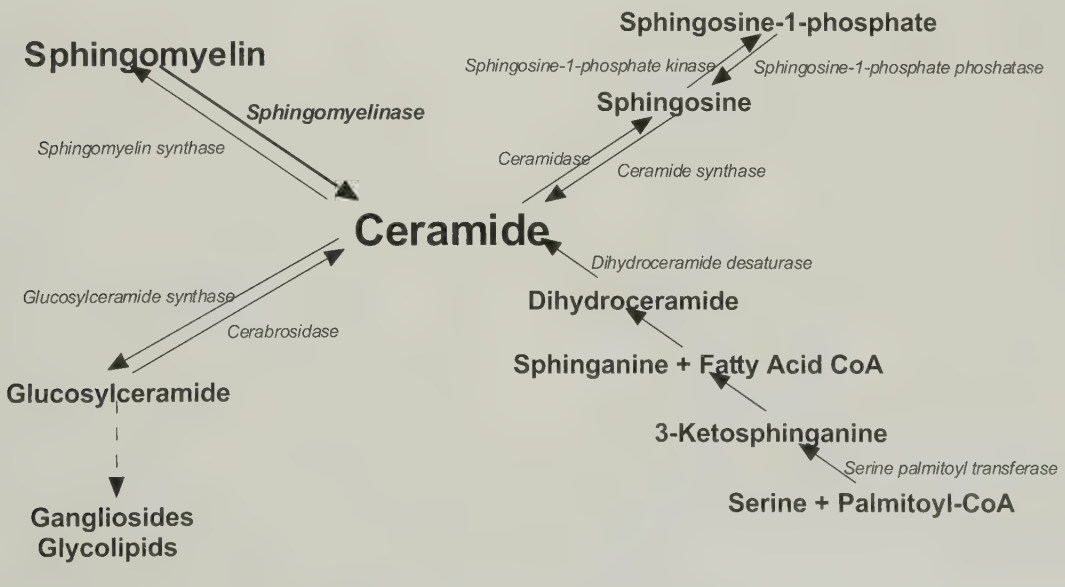
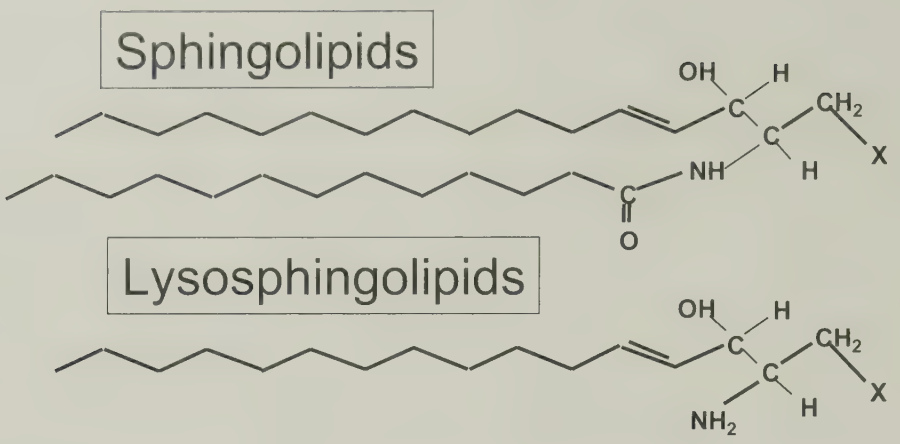


Fig. 2. Chemical structure of sphingolipids.



It adds to -X	Sphingolipids	Lysosphingolipids
-OH	Ceramide	Sphingosine
-PO_4	Ceramide-1-phosphate	Sphingosine-1-phosphate
-Phophorylcholine	Sphigomyelin	Lysosphingomelin
-Sugar chain	Glycosphingolipids	Glycolysosphingolipids

Fig. 3. Pathways of ceramide metabolism

トイル CoA の縮合反応から始まる *de novo* でのセラミド合成経路，スフィンゴミエリンまたはスフィンゴ糖脂質の分解によってセラミドが生成される経路およびスフィンゴシン-1-リン酸からスフィンゴシン-1-リン酸ホスファターゼの脱リン酸反応によって始まるセラミドの合成経路である。生体内ではスフィンゴシンは，セラミドを経ることなく *de novo* 合成されることはない。このことから，生物学的にはスフィンゴ脂質の基本骨格はセラミドであると考えられる。また，無脊椎動物では魚類に存在しないセラミド関連のスフィンゴ脂質マンノシルイノシトールセラミドやマンノシジイノシトールセラミド（Becker and Lester, 1980）が存在し，大腸菌内にもセラミドは存在しない。セラミド類似のスフィンゴ脂質の役割については不明な点が多いが，脊椎動物のスフィンゴミエリンと同様に，細胞膜を構成するリン脂質としての役割が考えられる。細胞内のスフィンゴ脂質量は，総リン脂質含量の内訳はスフィンゴミエリン 2.7%，セラミド 0.082%，スフィンゴシン 0.017% であり，スフィンゴシン-1-リン酸はさらに微量である（Merrill and Sandhoff, 2002）。また，セリンとパルミトイル CoA によりセラミドまでは小胞体で合成され，スフィンゴミエリンおよびスフィンゴ糖脂質はゴルジ装置で合成される。細胞外膜に多く存在するスフィンゴミエリンおよびスフィンゴ糖脂質はエンドソームによってリソソームへと輸送され酵素によって分解される。

ストレスによって生成されるセラミド

熱ショック，紫外線，放射線，過酸化水素などのストレスによって誘発されるアポトーシスでは，細胞内でセラミド量が一過的に増加するとともに，セラミドがアポトーシスの誘導シグナルとなり，カスパーゼカスケードを活性化してアポトーシスが実行されると Verheij ら（1996）は報告した。Obeid ら（1993）は，外因性 N-acetyl-sphingosine（C2-セラミド）をヒト白血病細胞 HL-60 細胞へ投与すると，ストレスを介さずに，カスパーゼカスケードが活性化されアポトーシスが生じると報告した。これらのことから，セラミドはアポトーシスを制御する脂質セカンドメッセンジャーとして位置づけられるようになった。

従来のアポトーシス研究では哺乳類の培養細胞系を実験材料として，培養液へのシグナル物質や阻害剤を添加することによって，その細胞でのアポトーシスに関与する酵素群を同定する手法が取られてきた。動物個体を用いる実験系では環境ストレスなどの外部刺激によるアポトーシスの誘導を観察するのが難しく，特定の細胞・組織でのアポトーシスの組織学的観察が主であった。また，セラミドはストレスによるアポトーシスの誘導物質であるが，*in vivo* での投与では血液中のリポタンパク質に吸着されるため，細胞内の生理的なセラミドの濃度領域でアポトーシスの誘導効果を調べることができなかった。しかし，魚類胚は培地中で

培養できる利点があり，セラミドや環境ストレスの効果を容易に観察することが可能となった（Yabu *el al.*, 2001a; Yabu *et al.*, 2003; Yabu *et al.*, 2005）。実際，ヒラメ胚やゼブラフィッシュ胚へ外因性のC2-セラミドを投与するとアポトーシスが誘導されるが，C2セラミドのアナログであるN-acetyl-dihydrosphingosine（C2-ジヒドロセラミド）には，生理活性が見られずアポトーシスは生じない。また，魚類胚では紫外線によって誘発されるアポトーシスと外因性のC2-セラミド投与によって生じるアポトーシスとが，ほぼ同じ部位で誘導されることから，紫外線ストレスとC2-セラミドの投与とが魚類胚に対してほぼ類似した効果がある（Yabu *et al.*, 2003; Yabu *et al.*, 2005）。

ストレスによって活性化される中性型スフィンゴミエリナーゼ

熱，紫外線などのストレスによって誘発されるアポトーシスは，細胞内のセラミドシグナルを介して，カスパーゼカスケードを活性化して実行される。最近の研究で，ストレス下でセラミド量を調節する分子として，ゼブラフィッシュZE細胞から中性型スフィンゴミエリナーゼが同定された（Yabu *et al.*, 2005）。まず，ゼブラフィッシュ胚由来の培養細胞，ZE細胞を使って，熱ストレス下でのセラミド含量の変化を調べたところ，熱ストレス処理後2時間でセラミド量が，コントロール区に比べて一過的に約2倍量まで増加した。この一過的に生成されたセラミド量の増加の後に，カスパーゼ活性が上昇し，アポトーシスが生じた。熱ストレスによって増加するセラミド生成には，*de novo* 合成経路のセラミド合成酵素やセリンパルミトイル転移酵素，スフィンゴミエリン合成酵素，酸性型スフィンゴミエリナーゼ，Mg^{2+}-非依存性中性型スフィンゴミエリナーゼ，Mg^{2+}-依存性中性型スフィンゴミエリナーゼ，セラミダーゼ，グリコシルセラミドトランスフェラーゼなどの酵素群が関わることが推定されるが，それらの酵素活性の測定，セラミド合成酵素阻害剤フモニシンB1の試験，細胞内のスフィンゴミエリン含量の測定の結果から，Mg^{2+}-依存性中性型スフィンゴミエリナーゼが熱ストレス下で活性化することが明らかとなった。そこで，ZE細胞からcDNAライブラリーを作製して，合成基質C6-nitro-benzoxadiazolyl-スフィンゴミエリンを用いる酵素活性を介した発現クローニング法によりMg^{2+}-依存性中性型スフィンゴミエリナーゼ活性を持つcDNAクローンを単離した（Yabu *et al.*, 2005）。さらに，本酵素の性状とアポトーシス誘導能を調べた。ゼブラフィッシュMg^{2+}-依存性中性型スフィンゴミエリナーゼは，420残基からなり，C末端側の2カ所に膜貫通領域を有した。組み換え型のスフィンゴミエリナーゼは，[^{14}C]-フォスファジルコリンを水解せず，[^{14}C]-スフィンゴミエリンを特異的に加水分解した。至適pHは，7.5で，Mg^{2+}イオンを必要とした。ZE細胞におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドによるタンパク質翻訳阻害試験では，熱ストレスによって誘導されるセラミド生成が阻害され，アポトーシスも抑制された（Yabu *et al.*, submitted）。これらのことから，熱ストレスによって誘発されるアポトーシスは，Mg^{2+}-依存性中性型スフィンゴミエリナーゼが活性化し，セラミドが一過的に生成された結果，カスパーゼカスケードが活性化される反応経路が重要であることが明らかとなった。

セラミドシグナルが介するアポトーシスの分子機構

紫外線を照射したゼブラフィッシュ胚ではセラミドが生成され，アポトーシスが発現するが，外因性のセラミドを投与したヒラメ胚やゼブラフィッシュ胚でも，アポトーシスが生じ，組織が崩壊した（Yabu *et al.*, 2003; Yabu *et al.*, 2005）。しかしながら，紫外線およびセラミドで胚を処理する際にカスパーゼ阻害剤Benzyloxycarbonyl-DEVD-fluoromethylketone（Z-DEVD-fmk）やセラミドの生合成経路上にあるスフィンゴシン-1-リン酸を培養液中に添加することによって，アポトーシスが抑制された（Yabu *et al.*, 2005）。このことから，ストレスによって生成されたセラミドがカスパーゼを活性化し，アポトーシスを誘導することが明らかとなった。魚類胚だけでなく，脊椎動物に共通するアポトーシスに誘導経路に関する新しいモデルを提案した（Fig. 4）。

以上のように，TUNEL染色，カスパーゼ活性，Mg^{2+}-依存性中性型スフィンゴミエリナーゼ活性，セラミド含量およびスフィンゴミエリン含量の測定によって，受精卵・仔魚へのストレスの影響を把握することが可能になった。魚類の初期発育過程における環境ストレスは胚における各組織，とくに膜鰭および脊髄でアポトーシスを生じさせ，形態形成異常をもたらした。このアポトーシスは，ストレスによって活性化したMg^{2+}-依存性中性型スフィンゴミエリナーゼが膜脂質スフィンゴミエリンを水解し，生成されたセラミドがシグナル物質として作用して，カスパーゼを活性化する反応経路が関与するものと推定される（Fig. 4）。この成果は，生態系における環境ストレス条件下での受精卵・仔魚の生残機構の解明と種苗生産技術における新しい飼育管理手法の開発に寄与するものである。

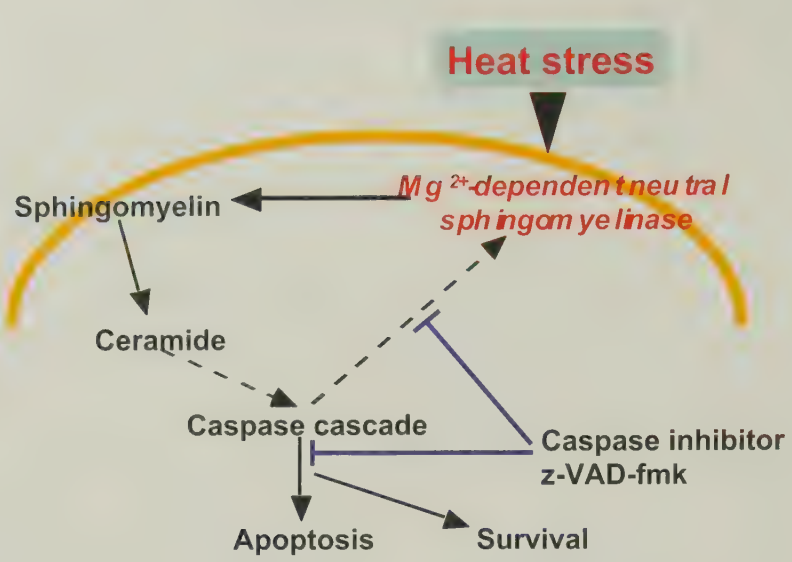


Fig. 4 Signaling pathway in stress inducible apoptosis

環境ストレスに伴うスフィンゴミエリナーゼの活性化機構

本研究で提案したモデルのなかで，Mg^{2+}-依存性中性型スフィンゴミエリナーゼの活性化機構とセラミドによって活性化されるカスパーゼ機構が依然不明である。まず，スフィンゴミエリンは，細胞膜の外膜上に存在するが，スフィンゴミエリナーゼは，分子構造データから細胞膜の細胞質側にスフィンゴミエリンを水解する活性中心が存在する。このことから，細胞が正常に生育する条件ではスフィンゴミエリナーゼは，スフィンゴミエリンには作用しないが，ストレス条件下では，細胞外膜側に存在するスフィンゴミエリンが細胞膜を横切り内膜側へ転移し，スフィンゴミエリナーゼが作用してセラミドが生成されると推定される。このような膜の転移の機構に関する仮説として，1) スフィンゴミエリンを内膜へ特異的に取り込むトランスポータータンパク質による，2) フリップ・フロップによる外膜から内膜へのリン脂質の転移，3) アポトーシスの際に生じる膜脂質の混合（scrambling）による，4) スクランブルアーゼの作用による，などの分子機構が考えられた。また，熱ストレスよるアポトーシスには，セラミドが細胞内シグナルとしてカスパーゼ-3 を介するアポトーシスを誘導するが，セラミドそのものはカスパーゼ-3 を活性化する作用を示さない。したがって，カスパーゼ-3 の活性化を誘導する機構にセラミドが関与すると予想される。例えば，カスパーゼ-3 の上流に位置するミトコンドリア経路は，チトクロム C と Apaf-1 の複合体の形成（アポソーム）がカスパーゼ-3 の活性化する。この複合体の形成過程にセラミドが関与しているかもしれない。今後，ストレス誘導性アポトーシスの分子機構を解明するうえで，これらは重要な研究テーマとして位置づけられる。

文　献

Becker G. W., Lester R.L., 1980: Biosynthesis of phosphoinositol-containing sphingolipids from phosphatidylinositol by a membrane preparation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol*. 142, 747-754.

Houde E.D., 1987: Fish early life dynamics and recruitment variability. *Am. Fish. Soc. Symp*. **2**, 17-19.

Ito L. S., Yamashita M., Strussmann C. A., 2003: Histological process and dynamics of germ cell degeneration in pejerrey *Odontesthe bonariensis* larvae and juveniles during exposure to warm water. *J. Exp.Zoolog. A. Comp. Exp. Biol*. **297**, 169-179.

Jones L. M., Michell. R. H., 1975: The relationship of calcium to receptor-controlled stimulation of phosphatidylinositol turnover. Effects of acetylcholine, adrenaline, calcium ions, cinchocaine and a bivalent cation ionophore on rat parotid-gland fragments. *Biochem. J*. **48**, 479-485.

Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R., 1972: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. **26**, 239-257.

Merrill A. H., Sandhoff K., 2002: Biochemistry of lipids, lipoprotein and membranes, 4th edition (Vance D.E,

Vance J.E., eds), Chapter 14, Elsevier, Amsterdam.

Obeid L. M., Linardic C. M., Karolak L. A., Hannun Y. A., 1993: Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769-1771.

Okazaki T., Bell R. M., Hannun Y. A., 1989: Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J. Biol. Chem*. 264, 19076-19080.

Roy M. N., Prince V. E., Ho R. K., 1999.: Heat shock produces periodic somitic disturbances in the zebrafish embryo. *Mech. Dev*. **85**, 27-34.

Strussmann C. A., Saito T., Takashima F., 1998: Heat-induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **119**, 637-644.

Thudichum J. L. W., 1884: A treatise on the chemical constitution of brain. Bailliere, Tindall, and Cox, London.

Yabu T., Todoriki S., Yamashita M., 2001a: Stress-induced apoptosis in zebrafish embryo by heat shock and UV and gamma-ray irradiation detected by increased caspase activity and whole mount TUNEL staining. *Fish. Sci*. **67**, 333-340.

Yabu T., Kishi S., Okazaki T., Yamashita M., 2001b: Characterization of zebrafish caspase-3 and induction of apoptosis through ceramide generation in fish FHM cells and zebrafish embryo. *Biochem. J.* **360**, 39-47.

Yabu T., Ishibashi Y., Yamashita M., 2003: Stress-induced apoptosis in larval embryo of Japanese flounder. *Fish. Sci.* **69**, 1218-1223.

Yabu T., Tomimoto H., Taguchi Y., Yamaoka S., Igarashi Y., Okazaki T., 2005: Thalidomide-induced anti-angiogenic action is mediated by ceramide through depletion of VEGF receptors, and antagonized by sphingosine-1-phosphate. *Blood* **106**, 125-134.

Yabu T., Imamura S., Yamashita M., Okazaki T., (submitted) : Identification of Mg^{2+}-dependent neutral sphingomyelinase 1 as a mediator of heat-induced ceramide generation and apoptosis. *J. Biol. Chem*.

Verheij M., Bose R., Lin X. H., Yao B., Jarvis W. D., Grant S., Birrer M. J., Szabo E., Zon L. I., Kyriakis J. M., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Kolesnick R. N., 1996: Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature,* **380**, 75-79.

水研センター研報，第26号，23－28，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 23－28, 2008

報　文

魚類細胞におけるストレス誘発オートファジー
魚類細胞におけるストレスによって誘発されるオートファジーの観察

藪　健史*・山下倫明*

Observation of Stress-Induced Autophagy in Fish Cells

Takeshi YABU*and Michiaki YAMASHITA*

Abstract Starvation is one of important stress conditions that cause various physiological dysfunctions and deteriorate fish quality as a food. Here, we developed a biomarker to detect the state of stress and/or starvation in fish and cultured cells. In particular, we focused on the autophagic pathway that forms autophagic vacuoles, *i.e.* autophagosomes, in the starved cells by the withdrawal of amino acids from culture medium. The autophagy has been characterized to be an apoptotic pathway induced by stress conditions, such as starvation, heat shock and hypoxia, followed by intracellular protein degradation (bulk degradation) differs from the ubiquitin-proteasome system. We used fish cultured cells as a model to evaluate the influence and the degree of biochemical changes by heat stress and amino acids starvation. A microtubule binding protein that localized in autophagosome membranes can be used as a molecular marker for induction of autophagy. We established stable transformants of ZE cell line introduced with a fusion protein of green fluorescent protein (GFP) and microtubule-associated protein 1-light chain 3 (MAP1-LC3) to detect fluorescent autophagosome associated with the GFP-MAP1-LC3-fusion protein. The induction of autophagy was examined under amino acids starvation and heat stress conditions. The high temperature and amino acids withdrawal in the ZE cells induced autophagy in time-dependent manner by counting the number of fluorescent particles localized with GFP-LC3 fusion protein in the cell. The autophagy induced by the amino acids withdrawal was suppressed in the presence of phosphatidylinositol 3 kinase inhibtor, 3-methyladenine, in the culture medium and by overexperssion of the bcl-2 gene. A phosphatidylinositol 3 kinase, target of rapamycin (TOR), mediated autophagic signaling pathway that executes the starvation induced-autophagy. Therefore, we proposed a new biological model of autophagic signaling pathway induced under heat stress and amino acid starvation conditions in fish cultured cells.

Key words : autophagy, protein degradation, amino acids starvation, heat stress, microtubule-associated protein 1-light chain 3

魚類における飢餓条件

魚類における初期減耗要因として被捕食および飢餓が重要である（Houde, 1987）。とくに受精卵・仔魚期における生残には，水温や飢餓が強く影響すると考えられる。受精卵・仔魚の生理状態を把握し，種苗としての品質を評価するためのバイオマーカーの開発が期待される。

また，魚類の生理機能の不全や品質の劣化をもたらす主要因として，飢餓による生理的変化が考えられる。水産物では，品質が時間とともに急速に低下し，生鮮食品および加工原料としての適性は大きく劣化する。この原因として筋肉タンパク質を特異的に分解するプロテアーゼが作用する例が報告されている（山下，

2008年4月23日受理　(Received on April 23, 2008)
* 中央水産研究所　236-8648　横浜市金沢区福浦 2-12-4 (National Research Institute of Fisheries Science, Fukuura, Kanazawa, Yokohama, 236-8648, Japan).
National Research Institute of Fisheries Science
*Tel: 81-45-788-7665. Fax: 81-45-788-5001. E-mail: mic@.affrc.go.jp

1994)。産卵のため回帰するサケの普通肉の筋肉では，リソソーム系プロテアーゼ活性のカテプシンL活性が非常に強い（Yamashita and Konagaya, 1990）。カテプシンLは，ミオシン，コネクチン，コラーゲンなどの筋肉のテクスチャーを形成する筋肉タンパク質に対して分解活性をもつ。産卵期サケ筋肉では，カテプシンLによるタンパク質分解活性によって，魚体やフィレーの低温貯蔵中にタンパク分解が生じた結果，著しい筋肉の軟化がしばしば生じる（山下，1994）。著しい肉質軟化が観察される産卵期サケの筋細胞間にはマクロファージ様の貪食細胞が分布し，その細胞にはカテプシンLが発現している。産卵期サケの筋肉の異常な軟化は，筋細胞に隣接した貪食細胞が，筋肉構造タンパク質や細胞小器官をエンドサトーシスによって貪食し，オートファジーによってタンパク質が消化されたと推測される（Yamashita and Konagaya, 1991）。ヒラメの異常軟化肉（Toyohara *et al.*, 1993）や産卵期のアユ（Yamashita *et al.*, 1990）でも強いカテプシンL活性が認められており，成熟や飢餓，感染などが引き金となりバルク分解経路が誘導された結果，著しい自己消化の原因となることが推定される。

以上のように，飢餓応答に関する生理学的・生化学的な解析の結果，リソソーム系のタンパク質分解経路の活性化，すなわちオートファジーの誘導が飢餓条件において生じると推測されるが，これまでの生化学的分析手法では，魚類のオートファジーの分子メカニズムを解析することは困難であった。そこで，魚類のストレス応答や飢餓状態を定量的に把握するため，アミノ酸飢餓や熱ストレスによって誘発されるオートファジーの発現に着目した。分子生物学的指標となるバイオマーカーを開発し，アミノ酸飢餓や熱ストレスによって誘発されるオートファジーの誘導経路を特定した。

オートファジーのバイオマーカー

出芽酵母，線虫，ショウジョウバエ，哺乳類などの多くの生物でオートファジーが解析され，オートファジーのバイオマーカーとしてオートファゴソーム膜に特異的に結合する微小管結合タンパク質 Microtubule-associated protein 1-light chain 3（MAP1-LC3）が報告されている（Kabeya et al., 2000）。MAP1-LC3は，定常状態ではポリペプチドのC末端側のグリシン残基の位置で切断されて細胞質に分布する。この分子の状態をMAP1-LC3-Iフォームという。オートファジー誘導下では，フォスファチジルエタノールアミン転移酵素の作用により，MAP1-LC3-IのC末端のグリシン119番目へフォスファチジルエタノールアミンが付加されることによって，MAP1-LC3-IIフォームとなり，本分子は活性化される。このようなMAP1-LC3-IIはオートファーゴソームの脂質二重膜の内外膜に結合するため，MAP1-LC3に対する特異的抗体を用いて蛍光抗体法で細胞内に生じたオートファーゴソームを顆粒として検出することができる。また，ウエスタンブロットでは，化学修飾された活性型のMAP1-LC3-IIフォームは，SDS-PAGEの陽極側にバンドの位置がシフトするため，MAP1 LC3-Iフォームと MAP1 LC3-IIフォームを特異的に検出することが可能であり，オートファジーの誘導能やその応答性を評価することができる。

ゼブラフィッシュ，ブリなどの魚類培養細胞をモデルとして，飢餓条件，すなわちアミノ酸を含まない培養条件によって誘発されるオートファジーを観察した。このようなオートファジーのバイオマーカーであるMAP1-LC3の遺伝子をゼブラフィッシュ，ブリ，ヒラメ，マグロからクローニングした。このcDNAのN末端側に緑色蛍光タンパク質を融合したキメラタンパク質の遺伝子発現系を作製し，それを導入したゼブラフィッシュの細胞株を樹立した（Fig. 1）（Yabu *et al.*, submitted）。この細胞株は，オートファジーの誘導に伴って，蛍光性のGFP-MAP1-LC3融合分子がオートファーゴソーム膜に結合するため，蛍光性の顆粒，すなわちオートファーゴソームが細胞内に出現する。さらに，このGFP-MAP1-LC3融合遺伝子発現系を導入したトランスジェニック魚の系統化した。これらの培養細胞や魚類は蛍光性のオートファーゴソームを検出することによって，オートファジーの動態を観察することが可能であるため，魚類における飢餓条件，オートファジーの誘導メカニズムなどの研究に利用できる。

二つの細胞内タンパク分解系

真核細胞に共通したタンパク質分解系として，二つの経路が存在する。前者のユビキチン－プロテアソーム系は，特定の基質分子だけを特異的に分解除去するために作用する選択的な分解系である。Nエンドルールに従って，タンパク質のN末端領域にあるアミノ酸配列に応じて，ユビキチンがタンパク質のリジン残基に付加される。このユビキチン化されたタンパク質は，ユビキチンが標識なり，プロテアソームに認識されるよって分解される。後者は，オートファジーであり，細胞内で不要となったタンパク質や細胞内小器官をオートファーゴソームに取り込んで，リソゾームと

結合して除去する非選択的な分解系である。

実際には，両者は細胞内で密接に関連している。ストレス条件下で生じた異常タンパク質や一過的に誘導されるシグナル分子は，その後，ユビキチン化され，プロテアソームによって速やかに分解されるが，分解されきれないユビキチン化タンパク質は他の多くの細胞内タンパク質と同様にオートファジーによっても分解されると考えられる。

飢餓適応としてのオートファジー

飢餓時には，異化作用が高まり，タンパク質，グリコーゲンおよび中性脂肪を分解し，ATP 合成に利用される。生体内のグルコースの貯蔵が枯渇すると，糖新生が活性化される。オートファジーによって生じるアミノ酸の一部はその材料に用いられると考えられる。この過程ではアミノ酸の脱アミノ反応が作用し，この結果生じた有毒なアンモニアの大半は，鰓による拡散や尿として排出される。肝臓以外ではとくに筋肉で分岐鎖アミノ酸の脱アミノ反応の活性化により，アミノ基のほとんどはピルビン酸，α－ケトグルタル酸やグルタミン酸に転移され，それぞれはアラニンやグルタミンとして血中に放出される。肝臓はアラニンを受け取り，これを利用して糖新生が生じる（グルコース－アラニン回路）。脱アミノされたアミノ酸の C 骨格は，各組織でクエン酸回路を経由してエネルギー産生へと利用される。このようにして，アミノ酸は，タンパク質合成，糖新生およびエネルギー産生と多岐にわたる機能を有しており，オートファジーはそれを制御する主要な機構であると考えられる。

飢餓適応としてオートファジーの重要性は，魚類以外のモデル生物では，オートファジー不能変異体の解析によって明らかにされてきた。オートファジー不能酵母は，栄養飢餓時に速やかに死滅する（Tsukada and Ohsumi, 1993）。細胞性粘菌（Otto *et al*., 2003）やショウジョウバエ（Scott *et al*., 2004）のオートファジー変異体も飢餓時には生存率が低下する。マウスは，出生直後の新生児は胎盤を介した栄養が突然遮断されることにより極度な飢餓状態であることが知られている（Kuma *et al*., 2004）。出生直後の新生児マウスの様々な組織でオートファジーが一過的に誘導される。マウスでは生理的飢餓状態に対してオートファジーが重要であると考えられる（Kuma *et al*., 2004）。ショウジョウバエ幼虫は，第 3 齢期より摂餌を離れ飢餓状態となり，やがて蛹になると完全な飢餓状態となるが，オートファジーが生じないと致死となる（Scott *et al*., 2004; Juhasz *et al*., 2003）。魚類の発生過程では，卵黄吸収がオートファジーによって生じ，卵黄タンパク質が分解されるとともに，形態形成が進行していた（今村ら，2008）。甲状腺ホルモンによって誘導される変態期では，摂餌量が低下することが知られている。この変態期においてもオートファジーが必要であると推測される。

オートファジーは栄養飢餓時に激しく誘導される。哺乳類の培養細胞の培地から，アミノ酸あるいは血清を除去すると 1 時間以内にオートファジーが誘導されるが，ゼブラフィッシュ胚由来細胞やブリ尾鰭由来細胞の場合，1 時間後から誘導される（Fig.1）。また，この誘導は，Bcl-2 や 3- メチルアデニン（3-MA）によって阻害されることから，PI3 キナーゼクラス III の経路がオートファジーを抑制するシグナル経路に関わることが明らかとなった。また，アミノ酸そのものにオートファジー抑制作用があることは明らかであるが，生体では，血中のアミノ酸濃度は，絶食後ではほとんど変動しない。オートファジーは，インスリン様成長因子 -1（IGF-1），インスリンやレプチンを中心とした内分泌系によって制御されていると推測されるが，魚類の場合，これらのホルモンが，細胞内タンパク質代謝を司る機能を有するかは不明である。ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析では，ショウジョウバエ幼虫を栄養飢餓状態にすると，脂肪体（Fat body; 魚類の肝臓にあたる臓器）オートファジーが誘導された。しかし，インスリンシグナルの高発現変異体やインスリンシグナルの負の制御因子を欠く変異体では，オートファジーが誘導されない（Scott *et al*., 2004）。一方，インスリンシグナル伝達因子の欠損変異体は，飽食時でもオートファジーが誘導された。

TOR キナーゼによるシグナル伝達機構

これらの一連のオートファジー抑制シグナルで最下流に位置するシグナル分子が Target of rapamycin（TOR）キナーゼである（Noda and Ohsumi, 1998）。魚類の培養細胞への栄養源の供給を阻害した条件で，蛍光顕微鏡下でオートファゴソームの形成を調べた結果，飢餓条件によって時間依存的にオートファジーが誘導され，蛍光性の顆粒が細胞内で多数生じた。このことから，飢餓に対する適応能は細胞レベルで獲得しており，適応応答することが明らかとなった。オートファジーのシグナル伝達の抑制機構を調べるため，3-MA やワルトマニン（PI3 キナーゼ阻害剤）の培地への添加試験，Bcl-2 または細胞分裂周期遺伝子 48（cell division cycle CDC48/VCP/p97）の過剰発現試験の結果，アミノ酸飢餓条件下で誘発されるオートファ

ジーが阻害された。このことから，アミノ酸飢餓によって誘発されるオートファジーは，PI3キナーゼ経路を介してオートファジーが抑制された。このことから，PI3キナーゼを活性化させる因子として，アミノ酸およびIGF-1が考えられた。そこで，アミノ酸飢餓状態下に魚類の培養細胞を曝しオートファジーを誘導したのち，アミノ酸投与またはヒトIGF-1の刺激の試験の結果，アミノ酸飢餓条件下で誘導されるオートファジーは消失した。このように，魚類における飢餓誘導性オートファジーは，TORキナーゼに依存することが推定された。

本研究では，CDC48がTORキナーゼの基質として，C末端領域にあるセリン784番目が特異的にリン酸化され，活性化する分子メカニズムを明らかにした。栄養源が充足した条件では，TORキナーゼは定常的に活性化しているため，CDC48はTORキナーゼのリン酸化によって活性化され，タンパク合成，細胞増殖および細胞分裂が促進される。活性型のCDC48リン酸化型は，ユビキチン プロテアソーム経路によるタンパク分解を促進し，細胞分裂周期を制御している。

魚類のシャペロン介在性オートファジー

産卵のため回帰するサケは，河川への遡上の約二ヶ月前に摂食を離れ，飢餓状態となる。この産卵期における飢餓時では，肝臓や筋肉の細胞内に蓄積された糖や脂肪を利用して，解糖系やTCA回路そしてβ酸化により，エネルギーを生産する。各組織における糖や脂肪が枯渇すると，マクロファージ様の貪食細胞によりエンドサトーシスによって筋肉構造タンパク質や細胞小器官が食され，オートファジーによるタンパク質分解によってアミノ酸が産生される。グルコース アラニン回路を主に利用して生きながらえていると推測される。さらに飢餓が長期になるとシャペロン介在性オートファジー（chaperone mediated autophagy）が誘導されていると推測される。この経路は，オートファゴソームを経由せずに基質タンパク質がリソソーム膜を直接透過して内腔へ輸送される。そのため分解基質は細胞質に局在するHSC70（Heat shock cognate protein 70）によって認識される。シャペロン介在性オートファジーは，オートファジーの中でも選択性を有し，HSC70との基質の複合体はリソソーム膜に結合し，基質は解きほぐされてからリソソーム膜を通過する。シャペロン介在性オートファジーは，細胞小器官を分解するのではなく可溶性タンパク質の分解に適していると考えられている（Dice, 1990）。シャペロン介在性オートファジーは，オートファジーと同様に，飢餓や酸化ストレス，毒性化学物質などによって活性化することが知られている（Dice, 1990）。哺乳類の研究では，シャペロン介在性オートファジーの基質タンパク質は，アルドラーゼ，Glyceraldehydephosphate dehydrogenase（GAPDH），ヘモグロビン，ミクログロブリン，HSC70などが同定されている（Dice, 1990）。

サケ稚魚を20日間無給餌で飼育試験した場合，筋肉中の水溶性タンパク質であるアルドラーゼ，GAPDHおよびパルブアルブミンが減少した（山下・鈴木, 1996）。産卵期サケでは，普通筋の筋肉中のアルドラーゼが特異的に減少した（Yamashita and Konagaya, 1991）。また，ブリ鰭由来の培養細胞を熱ストレス条件下やアミノ酸飢餓条件下で培養すると，HSC70がリソソームへ移行し，シャペロン介在性オートファジーが誘導された（Yabu *et al.*, submitted）。このように，HSC70の基質となりうるタンパク質が特異的に減少したことから，とくに魚類の極度な飢餓状態では，シャペロン介在性オートファジーが活性化するものと推測される。

以上の結果から，Fig. 2のように魚類のストレス状態や飢餓条件におけるオートファジーの誘導の新しいモデルを提案する。すなわち，細胞が飢餓状態に曝されると，グルコース，ATPなどのエネルギー源が低下するため，TORキナーゼのリン酸化シグナルが減少し，タンパク質合成能，タンパク質翻訳能および細胞分裂能などの細胞増殖に関わる機能が低下する。TORキナーゼ活性の減少によって，基質分子であるCDC48，Eukaryotic translation initiation factor 4 elongation binding protein（4EBP1），p70S6キナーゼのリン酸化が抑制されるとともに，脱リン酸化されるため，異化作用が促進される。また，CDC48によって制御されるユビキチン-プロテアソーム系の経路が停止する。細胞分裂周期が停止するとともに，オートファジーによるタンパク分解経路が活性化する。タンパク分解によって生じたアミノ酸を用いて，異化作用および糖新生作用が向上する。今後，これらのオートファジー誘導に関わるバイオマーカーを利用して，受精卵・仔魚における大量死，魚類の変態，産卵期サケの筋肉におけるタンパク分解などの現象について，その分子機序を解明する予定である。

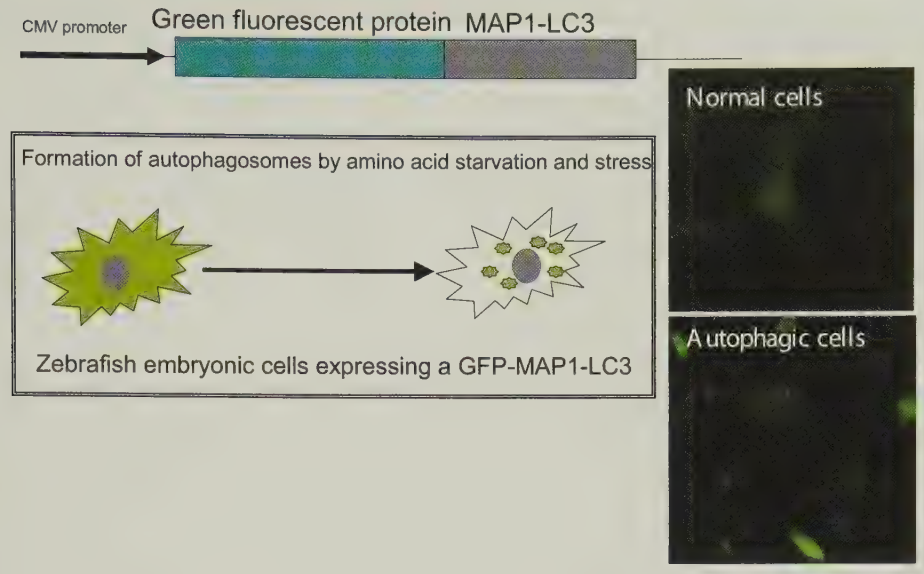

CMV promoter
Green fluorescent protein MAP1-LC3
Formation of autophagosomes by amino acid starvation and stress
Zebrafish embryonic cells expressing a GFP-MAP1-LC3
Normal cells
Autophagic cells

Fig. 1 The constructed plasmid with zebrafish microtubule-associated protein 1-light chain 3 (MAP1-LC3) A plasmid constructed that contained the zebrafish MAP1-LC3 cDNA under the control of the CMV promoter was generated and fused to the green fluorescent protein (GFP) gene (pEGFP-C1; Clontech) . Autophagy was induced in response to amino acid withdrawal in zebrafish embryonic cells expressing a fluorescent MAP1-LC3 autophagosome marker.

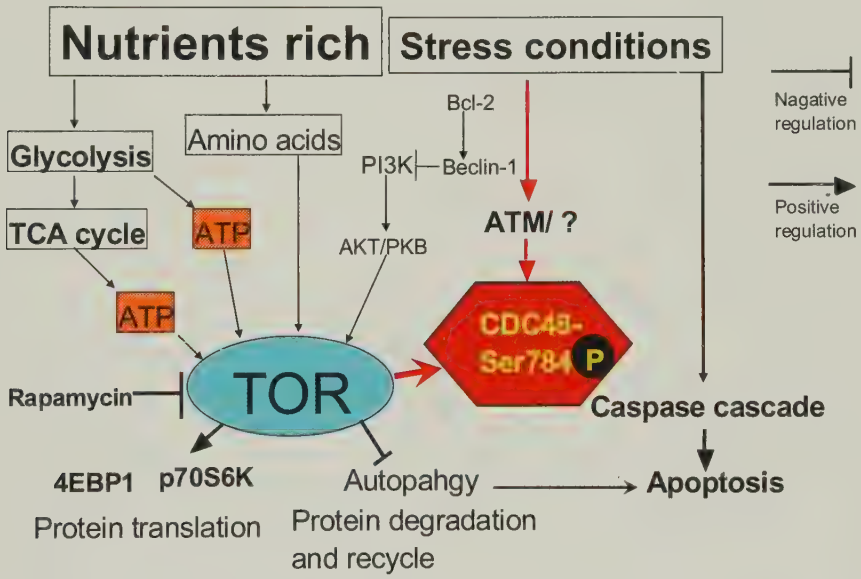


Fig. 2 A model of autophagic signaling pathway induced under stress and starvation conditions in the fish cells.

文　献

Dice J. F., 1990: Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 305-309.

Houde E. D., 1987: Fish early life dynamics and recruitment variability. *Am. Fish. Soc. Symp*, . **2**, 17-19.

Juhasz G., Csikos G., Sinka R., Erdelyi M., Sass M., 2003: The Drosophila homolog of Aut1 is essential for autophagy and development. *FEBS Lett.*, **543**, 154-158.

Kuma A., Hatano M., Matsui M., Yamamoto A., Nakaya H., Yoshimori T., Ohsumi Y., Tokuhisa T., Mizushima N., 2004: The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 432,

1032-1036.

Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., Yoshimori T., 2000: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.*, **19**, 5720-5728.

Medina J. M., Vicario C., Juanes M., Fernfindez E., 1992: Biochemical adaptations to early extrauterine life. *Perinatal Biochemistry, CRC Press, Boca Raton.*, 233-258.

Noda T., Ohsumi Y., 1998: Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J.Biol.Chem.*, 273, 3963 3966.

Imamura S., Yabu T., Yamashita M., (submitted) : *In vivo* analysis of autophagy in response to starvation using transgenic zebrafish expressing a fluorescent.

今村伸太朗, 藪健史, 山下倫明, (投稿中) : 魚類の胚発生におけるオートファジーが関与する卵黄吸収機構, 水産総合研究センター研究報告 .

Otto G. P., Wu M. Y., Kazgan N., Anderson O. R., Kessin R. H., 2003: Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum. J.Biol.Chem.*, **278**, 17636-17645.

Scott R. C., Schuldiner O., Neufeld T. P., 2004: Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Dev.Cell*, **7**, 167-178.

Toyohara H., Kinoshita M., Ando M., Yamashita M., 1993: Elevated activity of cathepsin L-like protease in jellied meat of Japanese flounder. *Nippon Suisan Gakk.*, **59**, 1909-1914.

Tsukada M., Ohsumi Y., 1993: Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett.*, **333**, 169-174.

Yabu T., Imamura S., Yamashita M., (submitted) : Characterization of microtubule-associated protein 1-light chain 3 (MAP1-LC3) from zebrafish; involving regulation of cell division cycle gene 48 (CDC48/VCP/p97) in amino acids starvation-induced autophagy

Yabu T., Imamura S., Mohammed M. S., Minami M., Terayama M., Yamashita M., (submitted) : Differential gene expression of three members of the stress protein HSP70/HSC70 family in response to heat shock and chaperone-mediated autophagy (CMA) in marine teleost yellowtail cultured cells.

Yamashita M., Nakano H., Konagaya S., 1990: The elevation of catheptic activity in muscle and liver of ayu Plecoglossus *altivelis* during maturation. Ibid, **56**, 1157.

Yamashita M., Konagaya S., 1990: High activites of cathepsins B, D, H, and L in the white muscle of chum salmon in spawning migration. *Comp. Biochem. Physiol*, . **95B**, 149-152.

Yamashita M., Konagaya S., 1991: Hydrolytic action of salmon cathepsins B and L to muscle structural proteins in respect of muscle softening. *Nippon Suisan Gakk.*, **57**, 1917-1922.

Yamashita M., Konagaya S., 1991: Proteolysis of muscle proteins in the extensively softened muscle of chum salmeon caught during spawning migration. *Nippon Suisan Gak.*, **57**, 2163.

山下倫明, 1994: 産卵期サケの肉質軟化機構に関する研究 . 日水誌, **60**, 439-442.

山下倫明, 鈴木満平, 1996: 飢餓に伴うサケ稚魚の筋肉におけるカテプシン活性の上昇 . 中央水研報, 8, 29-34.

水研センター研報，第26号，29－34，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 29－34, 2008

報　文

魚類の胚発生におけるオートファジーが関与する卵黄吸収機構

今村伸太朗*・藪　健史*・山下倫明*

Autophagy-Mediated Yolk Absorption during Fish Embryogenesis

Shintaro IMAMURA*, Takeshi YABU*, and Michiaki YAMASHITA*

Abstract Proteolytic degradation of yolk proteins is essential process for embryogenesis, homeostasis in fish. Since two different major pathways, *i. e.* ubiquitin-proteasome system and autophagy, have been well known in the animal cells, their roles for the yolk protein proteolysis during embryogenesis were characterized in the embryos of zebrafish and other fish species. Ubiquitin-proteasome system regulates ATP-dependent protein degradation specific to ubiquitinated proteins by proteasome, while autophagy regulates a process of bulky protein degradation via lysosomal/vacuolar system. The proteolytic processing of yolk protein in fish embryogenesis has been identified to be undertaken by lysosomal proteases. In order to characterize the molecular mechanisms on the proteolytic degradation of yolk protein, we examined roles of autophagy during embryogenesis. We established transgenic zebrafish lines, which are expressed a maker protein of autophagosome, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3) fused to green fluorescent protein (GFP), to visualize autophagosome formed by autophagy. The transgenic embryos were very useful to observe autophagic cells in embryos, and we detected the induction of autophagosome during early embryogenesis. The treatment of embryos with protease inhibitors, such as E-64 (inhibitor of cathepsins B and L) and proteasome inhibitor, effectively repressed yolk protein degradation and embryogenesis, suggesting that both autophagy and proteasome pathways are essential for degradation of yolk proteins.

Key words : Yolk absorption, proteolysis, autophagy, ubiquitin-proteasome pathway, zebrafish, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3)

魚類の卵黄タンパク質の利用

魚類の受精卵・仔魚期は，生活史のなかで死亡率が最も高い時期であり（Houde, 1987），好適な栄養源を利用できるかが，その後の生残および成長に強く影響する。魚類は卵に蓄積された卵黄成分を分解し，エネルギー源および栄養源として利用している（Davis *et al.*, 2007; Matsubara *et al.*, 1999; Ohkubo *et al.*, 2006）。卵母細胞成熟期に卵黄タンパク質が蓄積されるが，発生における卵黄吸収過程で卵黄タンパク質が特異的に分解されて，ペプチドおよび遊離アミノ酸が生成される（Matsubara *et al.*, 1999）。マミチョグやゼブラフィッシュの卵を研究材料として，成熟誘導ステロイドホルモン（17 α, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, DHP）を卵母細胞の器官培養系に投与することによって成熟を人為的に誘導し，卵黄タンパク質の分解過程を観察することができる（LaFleur *et al.*, 2005）。この培養系に各種プロテアーゼ阻害剤を添加することによって卵黄タンパク質の分解過程に関与するプロテアーゼが同定された。その結果，マミチョグの卵成熟過程における卵黄タンパク質の分解にはカテプシンBが，ゼブラフィッシュの場合には，カテプシンBお

2008年4月23日受理　(Received on April 23, 2008)
* 中央水産研究所　236-8648　横浜市金沢区福浦2-12-4 (National Research Institute of Fisheries Science, Fukuura, Kanazawa, Yokohama, 236-8648, Japan).

よびLが関与することが明らかにされた（Carnevali *et al.*, 2006; Raldua *et al.*, 2006）。また，サクラマス，イトウおよびヘダイでは，精製された卵黄前駆タンパク質ビテロゲニンに対して，プロテアーゼ源として卵母細胞の水溶性画分を反応させることによって，各種プロテアーゼ阻害剤を用いて卵黄タンパク質の分解の原因となる酵素として，カテプシンDが必須であった（Carnevali *et al.*, 1999; Hiramatsu *et al.*, 2002）。胚発生における卵黄タンパク質の分解には，酸性へのpH調節が重要であると考えられている（Cho *et al.*, 1999; Fagotto *et al.*, 1990; Fagotto *et al.*, 1994a, b; Nordin *et al.*, 1991; Selman *et al.*, 2001; Yamahama *et al.*, 2003）．すなわち，酸性条件下において，カテプシンB前駆体がリソソーム内において活性化することによって，リソゾームプロテアーゼ群のプロセッシング酵素として作用し，他の酵素を限定的に切断することによって，活性化させると考えられる。エンド型ペプチダーゼ活性を有するカテプシンL，ジペプチジルペプチダーゼ活性を有するカテプシンB，アミノペプチダーゼ活性を有するカテプシンH，カルボキシペプチダーゼ活性を有するカテプシンAなどのリソゾーム酵素が卵黄タンパク質を分解し，アミノ酸を生成すると考えられる。リソゾーム顆粒では，液胞型のH^+-ATPase（V-ATPase）によってpHが調節されるが，卵黄でもV-ATPaseが酸性顆粒の形成に重要な役割を果たしている（Fagotto *et al.*, 1994a, b; Raldua *et al.*, 2006）。V-ATPaseの阻害剤であるバフィロマイシンA1を卵に作用させることによって，pHの酸性化および卵黄タンパク質の分解が阻害されることが報告されている（Raldua *et al.*, 2006）。また，卵黄にはカテプシンBおよびLに対するタンパク性プロテアーゼインヒビターが含まれていることから（Yamashita and Konagaya, 1991; Yamashita and Konagaya, 1996），これらプロテアーゼインヒビターが，卵成熟および卵黄吸収における卵黄タンパク質の分解過程を調節する可能性が考えられる。

マミチョグ，ニジマス，マツカワ，ニホンウナギ，ゼブラフィッシュなどの魚種から少なくとも2種類のビテロジェニンをコードする遺伝子が見いだされ（Hiramatsu *et al.*, 2002a, b; LaFleur *et al.*, 1995; LaFleur *et al.*, 2005; Wang et al., 2000），魚類においても多型のビテロジェニンを持つことが明らかになった（Matsubara *et al.*, 2003）．Matsubara *et al.*（2006）は，マツカワ，ニホンウナギなどの海産魚の浮遊性卵を研究材料として，卵母細胞の最終成熟過程において，卵黄タンパク質の分解が誘導され，遊離アミノ酸が生成された結果，卵の浸透圧が上昇し，卵への吸水が生じることを明らかにした．マツカワの場合は，2つのビテロジェニン（VgA, VgB）をそれぞれ目的に応じて使い分けている（Matsubara *et al.*, 1999）。吸水のための浸透圧上昇因子としてVgAが利用され，胚発生の過程ではVgBが分解される（Matsubara *et al*, 1999）。このように，卵黄タンパク質の分解は，アミノ酸を栄養源として利用するだけでなく，浸透圧調節および浮遊適応に関与する重要な役割を果たしている。一般に海産魚の浮遊性卵は日周運動として垂直分布が変化することが知られており（Ito *et al.*, 1961; Tanaka *et al.*, 1989; Watabe *et al.*, 1970），浮遊適応は，生存適応戦略に関わる重要な生理機能であると考えられる。

卵黄吸収で働くタンパク質分解機構

タンパク質の分解経路はユビキチン－プロテアソーム系とオートファジーに分けられる。ユビキチン－プロテアソーム系は，分解されるべき個々のタンパク質に，8.6 kDaからなるユビキチン分子が複数結合することでプロテアソームにより選択的に分解される（Ciechanover *et al.*, 1981, Ciechanover *et al.*, 1982; Hershko and Ciechanover, 1992）。プロテアソームはタンパク質の分解を行う巨大な酵素複合体でありユビキチンリガーゼによってユビキチンが標識されたタンパク質を選択的に分解している。主に，細胞周期制御，免疫応答，シグナル伝達といった細胞中の様々な働きに関わっている（Rechsteiner *et al.*, 1993）。一方，オートファジーはリソソームを介した非特異的な分解経路である（Levine and Klionsky, 2004）。アミノ酸飢餓状態や異常タンパク質の蓄積が生じると，細胞質中で異常タンパク質を蓄積した細胞内顆粒オートファゴソームが形成される（Baba *et al.*, 1994）。オートファーゴソームは脂質二重膜を有しており，さらにこの顆粒形成が成長していくことで細胞質成分やオルガネラなどを二重のリン脂質の膜で取り囲んだ小胞が形成される。次にオートファゴソームと細胞内のリソソームが膜融合を起こし，リソソームに由来するさまざまな加水分解酵素によって内容物が消化されて，標的となる異常タンパク質はペプチドおよびアミノ酸に分解される。この分解経路は個体発生や神経疾患の防御などに働いていることが報告されている（Qu *et al.*, 2007; Rubinsztein, 2006）。マツカワ（Matsubara *et al.*, 2006）およびマミチョグ（Raldua *et al.*, 2006）で観察された卵黄吸収における卵黄タンパク質の分解には，リソソーム酵素が働いていること，バフィロマイシンA1で阻害されることなどから，卵母細胞の最終成熟過程における卵黄タンパク質の分解および卵の吸水現象

は，オートファジーの経路によって誘導されることが推定された。最終成熟のシグナルが引き金となって卵黄内でオートファジーが誘導される分子機構が推定される。

卵黄吸収における二つの分解経路の重要性

Amsterdam *et al.*（2004）は，ゼブラフィッシュの網羅的変異体スクリーニングにおいて，プロテアソームおよびユビキチンに関する変異体は胚発生致死であることを報告した。この変異体は灰色をした卵黄を持つことが記載されており，卵黄吸収過程の失調が疑われる。さらに，オートファジー関連因子であるATG欠損体マウスは，ほとんど正常に生まれるが，一日以内に死に至ることが報告されている（Kuma *et al.*, 2004）。そこで，魚類胚の卵黄タンパク質の分解経路および発生への影響を調べるには，各酵素に対する特異的な阻害剤を魚類卵に投与することが最適であると考え，プロテアソームおよびオートファジーに関連する阻害剤（10 mM E-64，10 mM ロイペプチン，200 μM Z-VAD-FMK，100 μM バフィロマイシン A1，10 mM MG-132）をゼブラフィッシュ胚に注入（1 nl/embryo）した。その結果，カテプシンBおよびLに対する阻害剤E-64およびロイペプチンを加えると卵黄タンパク質の分解が停止され，体節期以前で発生が停止した。さらにプロテアソームに対する阻害剤MG-132およびV-ATPaseの阻害剤バフィロマイシンA1は卵黄タンパク質の分解を部分的に阻害し発生が遅延した。これらの結果は，プロテアソームやオートファジーを介したタンパク質分解によるアミノ酸生成がエネルギー恒常性を維持し，初期胚における飢餓状態を補償するために重要であることを示している。このようなオートファジーの誘導経路として，マツカワ（Matsubara *et al.*, 2006）およびマミチョグ（Raldua *et al.*, 2006）で観察された卵黄球の酸性化と卵黄タンパク質の分解と同様に，DHPによる最終成熟のシグナルによって，受精前の排卵時に卵黄球におけるオートファジーが誘導されることが考えられる。上記の阻害剤を利用した分子の同定が重要な研究手段として他の魚種でも利用できる。

オートファジーおよびユビキチン–プロテアソーム系の魚類胚での可視化

ゼブラフィッシュでは，遺伝子導入技術が確立されていることから，研究対象となる目的のタンパク質と緑色蛍光タンパク質（GFP）とを連結したキメラ分子の遺伝子発現系を設計し，その遺伝子を導入したトランスジェニック魚類系統を作製することができれば，生体内での目的の蛍光タンパク質の挙動を蛍光顕微鏡下で可視化して追跡することができる。オートファジーの誘導を生体内で可視化するため に，Microtubule-associated protein 1 light chain 3（MAP1LC3）に対して蛍光タンパク質を連結したキメラ分子を発現する培養細胞株やトランスジェニックマウスが作出されている（Kabeya *et al.*, 2000）。MAP1LC3は，オートファゴソームを構成する分子であり，リン脂質が集積して脂質二重膜を形成し，細胞質成分やオルガネラなどを二重のリン脂質の膜で取り囲んだ膜顆粒が形成される。MAP1LC3と緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質（GFP-MAP1LC3）を発現するトランスジェニックフィッシュを作出し，生体内でのオートファジー活性化を観察した。初期胚のMAP1LC3の発現を，抗MAP1LC3抗体を用いたウエスタンブロット法によって，受精直後から体節期に活性化が検出された。トランスジェニックフィッシュにおけるGFP発現は生体内でリアルタイムに観察することができなかった。しかし，抗GFP抗体を用いた免疫組織学的観察によって，24時間胚では卵黄嚢の表面で陽性細胞を観察することができた。また，カテプシンLも免疫組織学的に卵黄嚢に局在していた。マミチョグの卵母細胞では，カテプシンL，BおよびFは卵黄の外縁部と卵黄小球で観察された（Raldua *et al.*, 2006）。また，マミチョグおよびゼブラフィッシュ胚では，カテプシンLのメッセンジャーRNAは卵黄嚢の表面で発現していた（Tingaud-Sequeira and Cerda, 2007）。卵黄動脈と周辺静脈／腸下静脈は脊椎動物の胚で卵黄吸収血管として位置づけられているが，ゼブラフィッシュ仔魚は両血管を欠いていることが報告されている（Fujita et al., 2006）ことから，卵黄で分解されたアミノ酸は心臓周辺の血管を通して血流に取り込まれていると推定している。さらに，ユビキチン–プロテアソーム系で分解される蛍光タンパク質（Ub-Y-YFP，YFP-CL1）（Menéndez-Benito *et al.*, 2005）を過剰に発現するトランスジェニックフィッシュも作製されている（Imamura *et al.*，投稿準備中）。これらの蛍光タンパク質はユビキチン化部位が導入されており，プロテアソームによって特異的に分解されるため，蛍光タンパク質の消失する部位を観察することによって，分解系の分布を調べることができる。卵黄吸収過程におけるオートファジーおよびユビキチン–プロテアソーム系の重要性を調べることが可能になると考えられる。

卵母細胞におけるオートファジーおよびユビキチン

オートファジー系の開始機構は成熟過程によって決定されるものと考えられる。オートファジーは栄養飢餓状態で活性化し，インスリン様増殖因子（IGF），Target of rapamycin（TOR）/PI3 キナーゼ経路を介した内分泌系によって制御されていると考えられている（Noda *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 2004; 藪ら，2008）。一方，卵黄吸収におけるオートファジーの誘導は，成体における栄養飢餓状態とは異なり，細胞増殖および細胞分化を伴うことから，卵黄吸収特有のオートファジー経路が存在すると考えられる。本研究で開発された GFP-MAP1LC3 トランスジェニックフィッシュの成熟過程を観察することができる。

卵黄吸収に関わる課題

種苗生産技術における課題として，卵質の向上を図る必要がある。卵質を決定する要因の一つとして，受精卵・仔魚の栄養物質である卵黄タンパク質や脂質，ミネラルの組成と分解・利用を担うオートファジーの細胞内機構が重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。海産魚に見られる浮遊性卵の場合と淡水魚の沈性卵とでは，卵黄タンパク質の分解およびオートファジーの誘導時期が大きく異なることから，各種酵素阻害剤を利用して卵黄吸収のメカニズムの共通性を魚種間で比較解析する必要がある。また，卵黄吸収過程にある胚では，オートファジーによるタンパク分解系が卵黄嚢および胚全体の細胞で生じているが，摂餌開始によって外部からの栄養源に切り替わる時期に代謝系の大きな転換が生じることから（佐々木，1989），このような代謝系の変化を生化学的に捉える研究が今後の課題である。環境水温の差違や運動の有無，摂餌開始のステージなども卵黄吸収と成長に影響することから（Cavalli *et al.*, 1997；西田・小林，1971；佐々木，1989），これらの環境条件や生理条件によってオートファジーが調節されるものと推定される。

文　献

Amsterdam A., Nissen R.M., Sun Z., Swindell E.C., Farrington S., Hopkins N., 2004: Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 12792-12797.

Baba M., Takeshige K., Baba N., Ohsumi Y., 1994: Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J. Cell Biol.*, **124**, 903-13.

Ciechanover A., Heller H., Katz-Etzion R., Hershko A., 1981: Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 761-765.

Carnevali O., Carletta R., Cambi A., Vita A., Bromage N., 1999: Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream Sparus aurata: involvement of two lysosomal proteinases. *Biol. Reprod.*, **60**, 140-146.

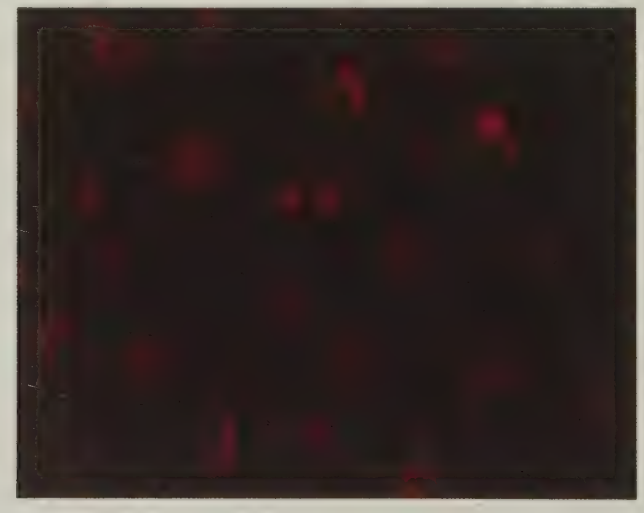


Fig. 1. Extensive induction of autophagy at surface of yolk-sac during zebrafish development. Zebrafish lines expressing autophagosome marker, EGFP-MAP1LC3 were generated. The red fluorescent dots indicate autophagic vesicle, *i.e.* autophagosome in a lot of cells of yolk sac. A embryo (24 hours after fertilization) was stained by anti-GFP antibody and visualized by anti-rabbit IgG labeling Alexa Fluor 594.

Carnevali O., Cionna C., Tosti L., Lubzens E., Maradonna F., 2006: Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **146**, 195-203.

Cavalli R.O., Kashiwagi M., Iwai T., 1997: Yolk utilization and growth of larvae of Japanese flounder Paralichthys olivaceus at different temperatures. *Bull. Fac. Bioresources, Mie Univ.*, **19**, 13-20.

Cho W.L., Tsao S.M., Hays A.R., Walter R., Chen J.S., Snigirevskaya E.S., Raikhel A.S., 1999: Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J. Biol. Chem.*, **274**, 13311-13321.

Ciechanover A., Elias S., Heller H., Hershko A., 1982: "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2537-2542.

Davis L.K., Hiramatsu N., Hiramatsu K., Reading B.J., Matsubara T., Hara A., Sullivan C.V., Pierce A.L., Hirano T., Grau E.G., 2007: Induction of three vitellogenins by 17beta-estradiol with concurrent inhibition of the growth hormone-insulin-like growth factor 1 axis in a euryhaline teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) . *Biol. Reprod.*, **77**, 614-625.

Fagotto F., 1990: Yolk degradation in tick eggs: II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **14**, 237-252.

Fagotto F., Maxfield F.R., 1994a: Yolk platelets in Xenopus oocytes maintain an acidic internal pH which may be essential for sodium accumulation. *J. Cell Biol.*, **125**, 1047-1056.

Fagotto F., Maxfield F.R., 1994b: Changes in yolk platelet pH during Xenopus laevis development correlate with yolk utilization. A quantitative confocal microscopy study. *J. Cell Sci.*, **107**, 3325-3337.

Hershko A., Ciechanover A., 1992: The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 761-807

Hiramatsu N., Ichikawa N., Fukada H., Fujita T., Sullivan C.V. and Hara A., 2002: Identification and characterization of proteases involved in specific proteolysis of vitellogenin and yolk proteins in salmonids, *J. Ex.p Zool.*, **292**, 11-25

Houde E.D., 1987: Fish early life dynamics and recruitment variability. *Am. Fish. Soc. Symp.*, **2**, 17-29.

伊東祐方, 1961: 日本近海におけるマイワシの漁業生物学的研究. 日水研報, **9**, 1-227.

Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., Yoshimori T., 2000: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.*, **19**, 5720-5728.

Kuma A., Hatano M., Matsui M., Yamamoto A., Nakaya H., Yoshimori T., Ohsumi Y., Tokuhisa T., Mizushima N., 2004: The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, **432**, 1032-1036.

LaFleur G.J., Jr, Raldúa D., Fabra M., Carnevali O., Denslow N., Wallace R.A., Cerdà J., 2005: Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenins and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Reprod.*, **73**, 815-824.

Levine B., Klionsky D.J., 2004: Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.*, **6**, 463-477.

Matsubara T., Ohkubo N., Andoh T., Sullivan C.V., and Hara A., 1999: Two form of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, Verasper moseri, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev. Biol.*, **213**, 18-32.

Matsubara T., Nagae M., Ohkubo N., Andoh T., Sawaguchi S., Hiramatsu N., Sullivan C. V. and Hara A., 2003: Multiple vitellogenins and their unique role in marine teleosts. *Fish. Physiol. Biochem.*, **28**, 295-299.

松原孝博, 安藤忠, 大久保信幸, 澤口小有美, 2006: ウナギ卵黄タンパクの生化学, 分子動態と浮遊性調節への関与, 水産総合研究センター研究報告, 別冊第5号, 45-50

Mallya S.K., Partin J.S., Valdizan M.C., Lennarz W.J., 1992: Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. *J. Cell Biol*, . **117**, 1211-1221.

Menéndez-Benito V., Verhoef L.G., Masucci M.G., Dantuma N.P., 2005: Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system. Hum. *Mol. Genet.*, **14**, 2787-2799.

西田秀夫, 小林哲夫, 1971: サケの肝臓形成と卵黄吸収. 北海道さけ・ますふ化場研究報告, 25, 35-43.

Noda T., Ohsumi Y., 1998: Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.*, **273**, 3963-3966.

Ohkubo N., Sawaguchi S., Hamatsu T., Matsubara T., 2006: Utilization of free amino acids, yolk proteins and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of walleye pollock *Theragra chalcogramma*. *Fish. Sci.*, **72**, 620-630.

Qu X., Zou Z., Sun Q., Luby-Phelps K., Cheng P., Hogan R.N., Gilpin C., Levine B., 2007: Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell*, **128**, 931-946.

Raldúa D., Fabra M., Bozzo M.G., Weber E., Cerdà J., 2006: Cathepsin B-mediated yolk protein degradation during killifish oocyte maturation is blocked by an H^+-ATPase inhibitor: effects on the hydration mechanism. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **290**, R456-R466.

Rechsteiner M., Hoffman L., Dubiel W., 1993: The multicatalytic and 26 S proteases. *J. Biol. Chem.*, **268**, 6065-6068.

Rubinsztein D.C., 2006: The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, **443**, 780-786.

佐々木正吾, 1989: サケの餌付け時期に関する検討. 魚と卵, **158**, 17-22.

Scott R.C., Schuldiner O., Neufeld T.P., 2004: Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Dev. cell*, **7**, 167-178.

田中 克, 1976: 卵・稚仔の離合集散に関する生態学的考察. 水産海洋研究会報, **28**, 79-89.

Tanaka M., Goto T., Tomiyama M., Sudo H., Azuma M., 1989: Lunar-phased immigration and settlement of metamorphosing Japanese flounder larvae into the nearshore nursery ground. *Cons. Int. Explor. Mer.*, **191**, 303-310.

Tingaud-Sequeira A., Cerdà J., 2007: Phylogenetic relationships and gene expression pattern of three different cathepsin L (Ctsl) isoforms in zebrafish: Ctsla is the putative yolk processing enzyme. *Gene*, **386**, 98-106.

Wang H., Yan T., Tan J.T., Gong Z., 2000: A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. *Gene*, **256**, 303-310.

渡部泰輔, 1970: マサバの発育初期における形態・生態ならびに資源変動に関する研究 東海水研報, **62**, 1-283.

藪健史, 山下倫明, 2008: 魚類細胞におけるストレスによって誘発されるオートファジーの観察, 水産総合研究センター研究報告 投稿中

Yamashita M., Konagaya S., 1991: Cysteine protease inhibitor in egg of chum salmon. *J. Biochem.*, **110**, 762-766.

Yamashita M., Konagaya S., 1996: A novel cysteine protease inhibitor of the egg of chum salmon, containing a cysteine-rich thyroglobulin-like motif. *J. Biol. Chem.*, **271**, 1282-1284.

水研センター研報，第24号，35－39，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 35－39, 2008

報　文

魚類のストレス応答を制御する熱ショック転写因子

尾島信彦*・山下倫明*

Heat shock transcription factors: regulators of cellular stress response in fish

Nobuhiko OJIMA* and Michiaki YAMASHITA*

Abstract Fish are exposed to various environmental stressors such as temperature shifts, chemical contaminants, and low dissolved oxygen levels. In particular, adaptation to temperature shifts is essential for the survival of fish, which are poikilothermic animals. Thus, we have studied the molecular basis of the heat shock response in fish. Meanwhile, all organisms respond to high temperatures by inducing the expression of heat shock proteins (HSPs). Transcriptional activation of the eukaryotic HSP genes is regulated by heat shock transcription factors (HSFs), which bind to the heat shock element (HSE) in the upstream region of HSP genes. The HSF family consists of four members, HSF1-4, in vertebrates. In fish species, the expression of HSF1 and HSF2 genes has been detected in rainbow trout and zebrafish. New insights into the function of HSF family members have recently obtained from knockout mice that lack genes of the family. Here, we briefly review recent findings on the function and the activation mechanism of mammalian HSF, and we also review our studies on HSF1 in rainbow trout.

Key words : fishes, gene expression regulation, heat-shock response, heat shock transcription factor, *Oncorhynchus mykiss*

魚類は自然環境や養殖環境において，水温・重金属等の化学物質・溶存酸素量など様々な環境因子の変動に曝されている。これらの環境因子は魚類にストレス状態を引き起こす外部刺激，すなわちストレッサーとなりうる。ストレッサーには物理的・化学的・生物学的なものがある（室伏きみ子，2005）が，水温変化は物理的ストレッサーとなり変温動物である魚類の発生・成長・成熟に大きな影響を及ぼす。特にニジマスなどの冷水性魚類は気候変動などによる水温上昇の影響を受けやすいと考えられる。

生物は通常の生育温度より高い温度に曝されたとき，熱ショックに対する応答として細胞内でストレスタンパク質（Heat Shock Protein;HSP）群を誘導発現させる。発見当初HSPは「熱ショックタンパク質」と呼ばれたが，後に熱以外のストレッサーによっても発現が誘導されることが分かり「ストレスタンパク質」と呼ばれるようになった。しかし個々のタンパク質名は便宜上HSPのままである。HSPは熱などによって変性・凝集した細胞内タンパク質を再生する働き，いわゆる分子シャペロン機能を持つ。魚類ではゼブラフィッシュなど複数の魚種から主要なHSP遺伝子が単離され，その発現が解析されている（Basu *et al.*, 2002）が，機能の解析はほとんど進んでいない現状にある。

真核生物HSPの発現は熱ショック転写因子（Heat Shock transcription Factor;HSF）により転写レベルで制御されている。HSFタンパク質は三量体を形成してHSP遺伝子上流域にある熱ショックエレメント（Heat Shock Element;HSE）と呼ばれるDNA配列に特異的に結合し，HSP遺伝子の転写を調節する（Fig. 1）。筆者らは冷水性魚類におけるストレス応答の分子機構を明らかにするため，ニジマスからHSF1遺伝子を単離し，その生化学的な性状を解析した。本稿では筆者らの研究成果を含め，魚類のHSF遺伝子に関する最近の知見を紹介する。

2008年4月23日受理（Received on April 23, 2008）
* 中央水産研究所　〒236-8648　神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-4（National Research Institute of fisheries science, 2-12-4, Fukuura, Kanazawa, Yokohama 236 8648, Japan）

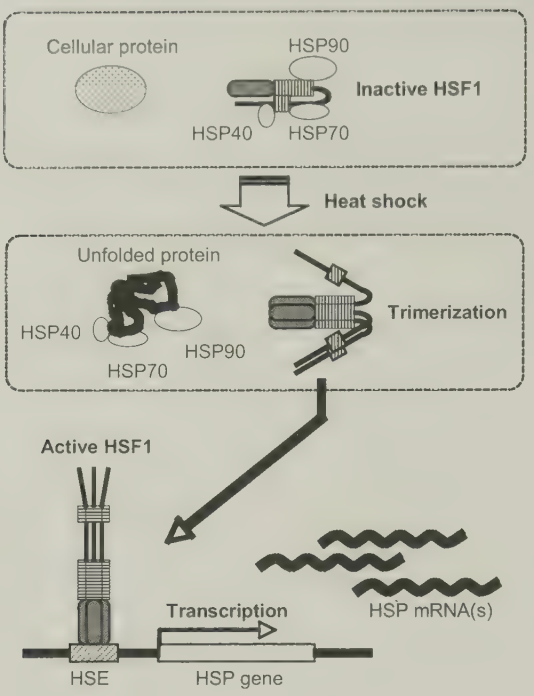


Fig. 1. Model of the regulatory mechanisms underlying the expression of heat-shock protein genes in mammalian cells. HSF1 is present mainly in the nucleoplasm as inactive monomers under normal conditions. The inactivation of HSF1 is associated with the binding of HSPs to the protein. When unfolded proteins accumulate in the cytosol by heat shock, HSPs dissociate from HSF1 to function as molecular chaperones. Subsequently, HSF1 acquires DNA binding ability through trimerization. Trimeric HSF1 binds to HSEs in the upstream region of HSP genes and activates their transcription.

熱ショック転写因子ファミリー

脊椎動物のHSFファミリーは4種類からなり，発見順にHSF1，HSF2，HSF3，HSF4と名付けられている。このうちHSF3遺伝子の存在が報告されているのはニワトリ *Gallus gallus* だけである。HSFタンパク質ファミリー間で保存性の高い領域は，DNA結合ドメイン（DNA-Binding Domain;DBD）とロイシンジッパー様構造の三量体形成ドメイン（Hydrophobic heptad Repeat-A/B;HR-A/B）である（Fig. 2）。HSF1からHSF3までは，カルボキシル末端側にもう一つロイシンジッパー様構造（HR-C）を持っている（Fig. 2）が，HSF4はHR-Cを持っていない。

HSFファミリーのうち魚類で遺伝子の発現が確認されているのはHSF1とHSF2であり，これら遺伝子が単離された魚種はニジマス（Le Goff *et al.*, 2004; Ojima and Yamashita, 2004）とゼブラフィッシュ（Råbergh *et al.*, 2000; Yeh et al., 2006）である。単離されたHSF1とHSF2は哺乳類のものと共通のドメイン構造（DBD，HR-A/B，HR-C）を保持している。

近年，様々な生物のゲノム情報がインターネット上で公開されており，DNA塩基配列情報から遺伝子の存在を予測することが可能となっている。欧州のEnsemblゲノムブラウザ（http://www.ensembl.org/index.html）では次の5魚種のゲノム情報が公開されている。トラフグ *Takifugu rubripes*，メダカ *Oryzias latipes*，イトヨ *Gasterosteus aculeatus*，ミドリフグ *Tetraodon nigroviridis*，ゼブラフィッシュ *Danio rerio*。これらのゲノム情報から魚類にはHSF1とHSF2に加えHSF4遺伝子も存在することが予測されるが，その発現はまだ *in vivo* で確認されていない。また予測によるとトラフグとミドリフグではHSF1とHSF4の2遺伝子しか存在しないようである。もしこの予測が正しければ，フグが既知の脊椎動物の中では最小のゲノムサイズをもつことから，脊椎動物に必要なHSFの最少セットはHSF1とHSF4であることが予想される。

熱ショック転写因子の機能

HSFファミリーの機能は各遺伝子を欠失させたノックアウトマウスの解析により明らかになりつつある。HSF1遺伝子欠失マウスは成体になるまで生き残るが，HSP遺伝子の誘導発現は消失する（Xiao *et al.*, 1999）。したがってHSF1は熱ショック応答の主要な転写制御因子である。HSF2遺伝子欠失マウスでは減数分裂時の染色体対合不全や精巣におけるアポトーシスの増加，メスの生殖能力異常，脳の形態変化が主な表現型として観察される（Kallio *et al.*, 2002）。一方，HSF2遺伝子欠失マウスは目立った表現型の異常を示さないという報告（McMillan *et al.*, 2002）もあり，HSF2の機能は完全には解明されていないと言える。なお，HSF1とHSF2両遺伝子を欠失させたマウスではオスが不妊になる（Wang *et al.*, 2004）。HSF4遺伝子欠失マウスは白内障を発症することから，HSF4は目のレンズ形成に特異的な機能を持つことが示唆されている（Fujimoto *et al.*, 2004）。

魚類ではHSF遺伝子の発現を阻害したノックダウンゼブラフィッシュの解析例がある。HSF1遺伝子の発現を阻害したゼブラフィッシュ胚では熱ショックによるアポトーシス細胞数が対照に比べて増加する（Wang *et al.*, 2001）。別の研究グループのノックダウンゼブラフィッシュ胚では眼が小さくなる表現型が観察され，HSF1がHSP70遺伝子の構成的なレンズ特異的発現制御に関与することが示唆されている（Evans *et al.*, 2007）。HSF2遺伝子の発現を阻害したゼブラフィッシュ胚では眼が小さくなる表現型は観察されない（Evans *et al.*, 2007）。ただし，これらの結果は遺伝子の欠失ではなく発現阻害の影響を観察したものであることから，魚類HSFの機能解明にはさらなる検証が必要である。

熱ショック転写因子の活性化

1）哺乳類HSF1の活性化機構

HSFファミリーのうち，熱ショック応答に必須であるHSF1の活性化機構が最もよく研究されている。HSF1の活性化は3つの過程に分けて考えることができる。単量体から三量体への転移，核内集積，広範な翻訳後修飾である。

単量体から三量体への転移にはロイシンジッパー様構造HR-A/BとHR-C（Fig. 2）が関与している。HSF1は非ストレス時にDNA結合活性を持たない単量体として細胞内に存在する。この単量体は，分子内ではHR-A/BとHR-Cとの疎水性相互作用により，また分子間ではHSP70やHSP90などのストレスタンパク質との結合により保持されていると考えられている。HSF1の三量体化機構としては次のようなモデルが広く受け入れられている。ストレッサーの影響で細胞内に増加した変性中間体タンパク質を修復するためにHSPがHSF1から遊離し，HSF1はDNA結合活性を持つ三量体へと転換する（Fig. 1）。HSF1三量体はHR-A/B同士の疎水性相互作用により保持されている。

核内集積については，細胞質に存在するHSF1単量体が三量体化して核内に移行するというモデルが一般に受け入れられていた。しかし近年の報告（Vujanac *et al.*, 2005）によると，不活性なHSF1単量体は主に核内に存在しており，核と細胞質の間を往復しているらしい。また，ストレッサーの影響で活性化されたHSF1単量体や三量体は細胞質から核内へ効率的に移行するが，逆に核内から細胞質への移行は非効率的であることが示されている。結果として活性化されたHSF1が核内に集積することになるようである。

翻訳後修飾については，HSF1は様々なストレッサーの影響により転写活性化能と関連する過剰リン酸

Fig. 2. Schematic representation of HSF1 domain structures. The DNA-binding domain (DBD) is the most conserved region among the HSF family members. HR-A/B and HR-C represent N-terminal and C-terminal hydrophobic heptad repeats, respectively. HR-A/B are involved in trimerization. HR-C is suggested to maintain HSF1 in an inactive state by interacting with the HR-A/B.

化を受けることが知られている。しかし，リン酸化によってHSF1の転写活性化能が増強されるという報告は少なく，多くはリン酸化によって転写活性化能が抑制されることが示されている（Anckar and Sistonen, 2007）

2）魚類HSF1の活性化

魚類HSF1は共通のドメイン構造を持つことから哺乳類HSF1と同様の活性化機構を持つと考えられる。魚類HSF1が熱ショックによってHSE結合活性を獲得することはニジマス（Airaksinen *et al.*, 1998; Le Goff and Michel, 1999; Ojima and Yamashita, 2004）およびゼブラフィッシュ（Evans *et al.*, 2007）で確認されている。しかし活性化機構の詳細についてはまだ不明な点が多い。

一方，筆者らはニジマスに2種類のHSF1アイソフォームが存在することを見出した（Ojima and Yamashita, 2004）。ニジマスの祖先種はゲノムが4倍体化したと考えられていることから，これらアイソフォームは遺伝子重複によって生じたパラログと推定される。2種類のアイソフォームを*in vitro*で発現させて多量体形成能を調べたところ，ニジマスHSF1はホモ三量体とヘテロ三量体の両方を形成することが明らかとなった。ヘテロ三量体化が*in vivo*でも起こるかどうかはまだ明らかでない。

魚類HSF1の特徴

魚類のHSF1で特徴的なのは哺乳類よりも活性化する温度が低いことである。哺乳類HSF1が約42℃で活性化するのに対し，魚類HSF1の活性化が確認された温度はゼブラフィッシュでは37℃（Evans *et al.*, 2007），ニジマスでは25℃（Ojima and Yamashita, 2004）である。このHSF1活性化温度の違いは各生物種が適応している環境温度を反映している。一方，マウスHSF1が*in vitro*で熱や過酸化水素によって直接活性化されて三量体化する（Ahn and Thiele, 2003）ことから，HSF1はそれ自体がストレスセンサーとして機能すると考えられる。しかしHSF1活性化の温度依存性は調べられておらず，HSF1のストレス感知能が生物種ごとに異なるのかは不明であり，今後の研究が待たれる。

また，ニジマスHSF1がヘテロ三量体を形成しうることは特徴的である。遺伝子重複によって生じたHSF1アイソフォームを持つ生物はニジマス以外に見つかっていない。一方，HSF1三量体が疎水性相互作用により保持されているとすれば，共通のHR-A/Bドメインを持つ分子同士が多量体を形成しても不思議ではない。にもかかわらず，脊椎動物のHSFファミリーはホモ三量体を形成すると一般に考えられてきた。しかし最近の報告（Loison *et al.*, 2006; Östling et al., 2007）によるとHSF1とHSF2がヘテロ三量体を形成して機能する可能性が示されている。ニジマスHSF1のヘテロ三量体にも特異的な機能が存在する可能性があり，新たな研究展開が期待される。

おわりに

哺乳類HSFファミリーの構造や機能は膨大な研究により次第に明らかとなってきた。その一方で魚類HSFファミリーの研究は端緒についたばかりである。変温動物である魚類の多くは卵生であり，発生段階から環境の影響を直接的に受ける。したがって細胞保護作用を持つHSPや，その発現を主に制御するHSFに関しては，魚類における研究がより必要であると考えられる。また進化的な観点からも魚類は脊椎動物におけるストレス応答の分子機構を研究するための理想的なモデル生物であると言える。今後，魚類HSFやHSPの発現および機能をさらに詳しく明らかにすることにより，自然環境や養殖環境における魚類のストレス度判定や，ストレス耐性を高めた魚類育種などへの展開が期待される。

文　献

Ahn S. G. and Thiele D. J., 2003: Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.*, **17**, 516-528.

Airaksinen S., Råbergh C. M. I., Sistonen L. and Nikinmaa M., 1998: Effects of heat shock and hypoxia on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cells. *J. Exp. Biol.*, **201**, 2543-2551.

Anckar J. and Sistonen L., 2007: Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **594**, 78-88.

Basu N., Todgham A. E., Ackerman P. A., Bibeau M. R., Nakano K., Schulte P. M. and Iwama G. K., 2002: Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, **295**, 173-183.

Evans T. G., Belak Z., Ovsenek N. and Krone P. H., 2007: Heat shock factor 1 is required for constitutive Hsp70 expression and normal lens development in

embryonic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **146**, 131-140.

Fujimoto M., Izu H., Seki K., Fukuda K., Nishida T., Yamada S., Kato K., Yonemura S., Inouye S. and Nakai A., 2004: HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development. *EMBO J.*, **23**, 4297-4306.

Kallio M., Chang Y., Manuel M., Alastalo T. P., Rallu M., Gitton Y., Pirkkala L., Loones M. T., Paslaru L., Larney S., Hiard S., Morange M., Sistonen L. and Mezger V., 2002: Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J.*, **21**, 2591-2601.

Le Goff P. and Michel D., 1999: HSF1 activation occurs at different temperatures in somatic and male germ cells in the poikilotherm rainbow trout. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **259**, 15-20.

Le Goff P., Le Drean Y., Le Peron C., Le Jossic-Corcos C., Ainouche A. and Michel D., 2004: Intracellular trafficking of heat shock factor 2. *Exp. Cell Res.*, **294**, 480-493.

Loison F., Debure L., Nizard P., Le Goff P., Michel D. and Le Drêan Y., 2006: Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes. *Biochem. J.*, **395**, 223-231.

Mcmillan D. R., Christians E., Forster M., Xiao X., Connell P., Plumier J. C., Zuo X., Richardson J., Morgan S. and Benjamin I. J., 2002: Heat shock transcription factor 2 is not essential for embryonic development, fertility, or adult cognitive and psychomotor function in mice. *Mol Cell Biol.*, **22**, 8005-8014.

室伏きみ子, 2005: ストレスの生物学, 第1版, オーム社, 東京, 136pp.

Ojima N. and Yamashita M., 2004: Cloning and characterization of two distinct isoforms of rainbow trout heat shock factor 1. Evidence for heterotrimer formation. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 703-712.

Råbergh C. M. I., Airaksinen S., Soitamo A., Björklund H. V., Johansson T., Nikinmaa M. and Sistonen L., 2000: Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *J. Exp. Biol.*, **203**, 1817-1824.

Vujanac M., Fenaroli A. and Zimarino V., 2005: Constitutive nuclear import and stress-regulated nucleocytoplasmic shuttling of mammalian heat-shock factor 1. *Traffic*, **6**, 214-229.

Wang G., Huang H., Dai R., Lee K. Y., Lin S. and Mivechi N. F., 2001: Suppression of heat shock transcription factor HSF1 in zebrafish causes heat-induced apoptosis. *Genesis*, **30**, 195-197.

Wang G., Ying Z., Jin X., Tu N., Zhang Y., Phillips M., Moskophidis D. and Mivechi N. F., 2004: Essential requirement for both hsf1 and hsf2 transcriptional activity in spermatogenesis and male fertility. *Genesis*, **38**, 66-80.

Xiao X., Zuo X., Davis A. A., Mcmillan D. R., Curry B. B., Richardson J. A. and Benjamin I. J., 1999: HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J.*, **18**, 5943-5952.

Yeh F. L., Hsu L. Y., Lin B. A., Chen C. F., Li I. C., Tsai S. H. and Hsu T., 2006: Cloning of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 2 (HSF2) and similar patterns of HSF2 and HSF1 mRNA expression in brain tissues. Biochimie., **88**, 1983-1988.

Östling P., Björk J. K., Roos-Mattjus P., Mezger V. and Sistonen L., 2007: Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. *J. Biol.Chem.*, **282**, 7077-7086.

水研センター研報，第24号，41－46，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26, 41－46, 2008

報　文

トラフグ *ra1dh2* のクローニング
－魚類ビタミンAの胚発生での役割解明に向けて－

宇治　督[*1]・黒川忠英[*1]・鈴木　徹[*2]

Molecular cloning of *ra1dh2* from *Takifugu rubripes*

Susumu UJI[*1], Tadahide KUROKAWA[*1] and Tohru SUZUKI[*2]

Abstract Embryonic development of organs and tissues in viviparous organisms such as mammals, particularly organs such as the central nervous system, heart and skeletons, is dependent upon vitamin A supplemented from the mother. Conversely, in fish, which are oviparous, embryogenesis is entirely dependent on nutrients stored mainly as yolk within eggs during vitellogenesis. It is therefore possible that abnormalities in seed production by broodstock may arise during embryogenesis in an aquacultural setting due to vitamin A deficiency or hypervitaminosis. The authors hypothesize that, not only is vitamin A metabolism essential to the development of mature female fish, but vitamin A transfer to the eggs is essential for healthy seed production. Here we review the role of vitamin A in mammals and fish. In addition, we describe the molecular characteristics and gene expression patterns in *Takifugu rubripes* retinaldehyde dehydrogenase 2 (raldh2), which converts retinal to retinoic acid, an active form of vitamin A that controls the mRNA expression of various genes involved in embryogenesis.

Key words : vitamin A, early development, malformation, metabolic pathway of vitamin A, raldh2

魚類種苗生産現場において、色素異常（特にヒラメ *Paralichthys olivaceus*、マツカワ *Verasper moseri* における白化、黒化現象）、骨形成異常（特にブリ *Seriola quinqueradiata* における上下顎骨異常、脊椎骨癒合、前頭骨異常）など、形態の異常な稚魚が多数発生することがあり問題となっている。

形態異常を考えるうえで非常に重要な要素は2つある。1つは原因要因、もう1つは時期的要因である。要因が何なのか、それがいつ起こるかによって、形態異常の表現型は大きく変わる。我々は1つのモデルとしてトラフグ *Takifugu rubripes* をもちいて、原因要因をビタミンAの活性本体であるレチノイン酸（RA）に決め、時期的要因を胚発生期に絞って実験を行い、有用魚種における胚発生と、稚魚および成魚における形態異常との関連を調べている。

ビタミンAは必須の栄養素として網膜における視覚としての作用だけでなく、脊椎動物の発生過程に重要な役割を持っている。このことは古くからの欠乏症、過剰症などの栄養学的、奇形学的研究からだけでなく、最近の分子生物学的なRAシグナル伝達機構の研究から明らかである。しかしながら、そのほとんどは哺乳類での知見であり、魚類での知見はモデル生物であるゼブラフィッシュに限られているのが現状である。哺乳類は「子が母体内で養分を受け、ある程度の発達を遂げたのち生まれる」胎生である。それゆえヒトなどでは、妊婦が皮膚病の治療薬としてレチノイド薬を経口投与されるとその影響で奇形胎児が生じる（Lammer et al. 1985）。魚類は「卵の形のままで母体外に産み出され、体外で発育して孵化する」卵生である。この産卵様式の違いは非常に重要である。胎生の場合、その発生は親の栄養状態の影響を直接受けるのに対し、卵生の場合、卵黄という栄養素のみで発生する。つまり

2008年4月23日受理　(Received on April 23, 2008)
[*1] 養殖研究所　〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422 1 (National Research Institute of Aquaculture,Fisheries Research Agency 422-1 Nakatsuhamaura, Minamiise, Mie, 516-0193, Japan)
[*2] 東北大学大学院農学研究科 〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1 (Laboratory of Bioindustrial Informatics, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aoba, Sendai, Miyagi 981-8555, Japan)

未受精卵の状態で必要な栄養素は親からすべて与えられていて、それ以降全く栄養素の供給はない。卵生の鳥類ウズラでビタミンA欠乏症があることが知られているように（Maden et al. 1996）、魚類の場合も親魚から与えられる栄養素としてのビタミンAの供給が適切でなければ、欠乏症、過剰症を引きおこす可能性がある。

ビタミンAの活性型であるRAを含む海水にヒラメやトラフグ仔魚を浸漬すると、色素異常や骨形成異常が起こる（Haga et al. 2003; 宇治ら、未発表）。これは孵化後に与える餌にビタミンAが過剰に存在すると、形態異常が起こる可能性があるということを示唆している。実際に、ヒラメにおいて餌料のビタミンAの多寡が形態異常を起こすことが知られている（Dedi et al. 1995; Takeuchi et al. 1998）。だがRAによる色素異常、骨形成異常は仔魚期のみに原因があるのであろうか。我々はRAレセプターがトラフグ胚発生において色素細胞系列前駆細胞で発現していることを観察している（宇治ら、未発表）。これは仔魚期におけるRAの浸漬実験によって色素異常が起こるという先ほどの事実と合致していると同時に、胚発生時においてもこれらの細胞系列にビタミンAが影響を与えうることを示唆している。例えば、孵化前の卵黄の中にあるビタミンAの過剰もしくは欠乏が発生初期の前駆色素細胞や前駆骨細胞などに影響を与え、表現型として検出されるのが仔魚期であるということはないのだろうか。

このような卵質に関わる発生異常、形態異常の問題は初期減耗抑制技術の開発に当たっては極めて重要な研究課題である。そこで、本プロジェクトでは有用魚種での卵内ビタミンAの胚発生での役割、そして形態異常への影響を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。ここでは「ビタミンA」という発生に重要な栄養成分であり、催奇形性因子でもある分子に関する知見、特に胚発生過程での機能の現状を我々の研究成果を含めて紹介する。

ビタミンAとは

ビタミンAは脂溶性ビタミンのひとつであり低分子化合物である。他の脂溶性ビタミンにはビタミンD、E、Kがあり計4種類知られている。水溶性ビタミンは9種類あり、ビタミンとしては合計13種類ある。ビタミンは一般に栄養物質として細胞内に摂取され、多くの場合酵素タンパク質の補助因子となる。水溶性ビタミンは体内で貯蔵できないので、毎日必要量を摂取しないと欠乏症になることがある。これに対して、脂溶性ビタミンは、体内に特定の貯蔵細胞が存在するなど、一般に長時間保持されるので水溶性ビタミンに比べて欠乏症に陥ることが少ない。また体内に蓄えられるという同じ理由で脂溶性ビタミンは過剰症が存在する。ビタミンA過剰症は人間の場合、少なくとも一日当たり15,000ー50,000IUを数ヶ月から1年以上摂取し続けると過剰症になるといわれている（Silverman et al. 1987）。ビタミンA過剰症の症状は多岐にわたり、食欲不振、肝機能異常、関節炎、頭痛、発疹などが認められる。そこで過剰症の発症という点から、一般に成人では25,000IU/日以上の摂取は避けるべきであるとされている*。ビタミンAには欠乏症も知られている。例えばビタミンA欠乏食で飼育したラットは生殖機能障害をきたす（Clagett-Dame et al. 2002）。ラットのビタミンA欠乏状態は、胎児に無眼症、小眼症などの眼の奇形、神経系の奇形、中軸骨格異常などを生じる（Morriss-Kay 1992; White et al. 2000; Kaiser et al. 2003）。また、ビタミンAは催奇形性があることでも知られている。ニキビの経口治療薬であるイソトレチノイン（ビタミンAの誘導体）の投与を受けていた母親は、奇形の子供を産む危険性が高くなる（Lammer et al. 1985）。さらに妊娠母獣にRAを投与すると、中枢神経系、顔面奇形、鰓弓奇形、眼の奇形、中軸骨格の奇形、四肢の奇形など、70種類以上の奇形を生じることが知られている（Shenefelt 1972）。後述するように内因性レチノイドは胎児の形態形成に関わる。そのレチノイドがなんらかの要因で外因的に与えられた場合、正常発生過程を攪乱する結果となり、このような作用がレチノイドの持つ催奇形性へと結びつくのであろう。

ビタミンAの代謝経路

食物中に含まれるビタミンAは大別すると、動物性食品由来の長鎖飽和脂肪酸と重合したレチニルエステルと植物性食品由来のカロテノイドがある。動物性食品由来のレチニルエステル（多くはパルミチン酸エステル）は、動物の肝臓、ウナギ、アナゴ、卵類、バターなどに多く含まれている。植物性食品由来のカロテノイドは、にんじん、ほうれん草などに多く含まれている。

小腸より吸収されたビタミンAは主として長鎖飽和脂肪酸と再びエステルを形成し、他の脂質と共にカ

* 日本ビタミン学会, 1996. ビタミンの事典. 朝倉書店

イロミクロン中に組み込まれて血液中へと輸送され、最終的には肝臓内に取り込まれ貯蔵される。小腸粘膜上皮細胞内におけるレチノールの再エステル化にはcellular retinol binding protein（CRBP）, acyl-CoA retinol acyltransferase（ARAT）、lecithin retinol acyltransferase（LRAT）が関与すると考えられている。レチノール自体は脂溶性であるので単独では血液に溶解しないが、肝臓に貯蔵されているレチニルエステルは必要に応じてLRATによって加水分解されてレチノールになった後、レチノール結合タンパク（RBP）に結合することで血液中での輸送が可能になる。レチノール・RBP複合体はレチノイドを必要とする組織の細胞に取り込まれる。この取り込み機構は長年議論の的となっていたが最近新たな知見が加わった。これまでは細胞膜上の特異的なレセプターを介するという説と、非特異的に膜を通過するという説とがあった。Kawaguchiら(2007)はRBPの細胞膜上のレセプターの存在を確認し、それが細胞内にレチノールを取り込む作用があることを示した。細胞内に取り込まれたレチノールは、酸化されレチナールとして作用するか、もしくはさらに酸化を受けてRAに代謝され生理作用を引きおこす。レチノールからレチナールへの代謝はアルコール脱水酵素であるRetinol dehydrogenase（RDH）が関与し、レチナールからRAへの代謝にはアルデヒド脱水素酵素であるretinaldehyde dehydrogenase（RALDH）が関与している（Fig. 1）。

魚類においては卵黄形成過程に卵にもレチノイドが輸送される。魚類の卵中のレチノイドの主なものはall trans型のレチナールである（Costaridis et al. 1996; Irie et al. 2002）。これら卵レチナールは肝臓でつくられ、同じく肝臓で合成されるビテロゲニンに結合した状態で卵に運ばれると考えられる。また油球を含む魚卵ではレチニルエステルを含むのに対し、油球を含まない魚卵ではレチナールがほぼ唯一のレチノイドであることが示唆されている（Irie et al. 2002）。

ビタミンAの生理作用

レチノイドは、視覚、生殖、形態形成、成長、分化誘導、免疫など多くの生理作用を持つことが知られている。そのほとんどの生理作用を担う本体としてRAが考えられている。

ビタミンAの活性本体であるRAのうち、all trans-RAは核内レセプターであるRA受容体（RAR）と、9-cis RAは同じく核内レセプターであるRA受容体（RXR）のリガンドとして働く（Chambon 1996）。核内レセプターは、生理活性物質をリガンドとした転写調節因子の一つであり、Hox遺伝子を初めとする様々な標的遺伝子の発現を転写レベルで調節する（Fig. 1）。脊椎動物の体作りに劇的な効果を与えるのは、このようにビタミンAの活性本体であるRAが転写調節因子の活性化を直接引き起こすリガンドとして発生の制御に働くためである。

よく知られたRAの発生制御のシグナルとしての形態形成作用の例ではマウス、ラットでのHox遺伝子を介した後脳領域のパターニングがある。後脳にはロ

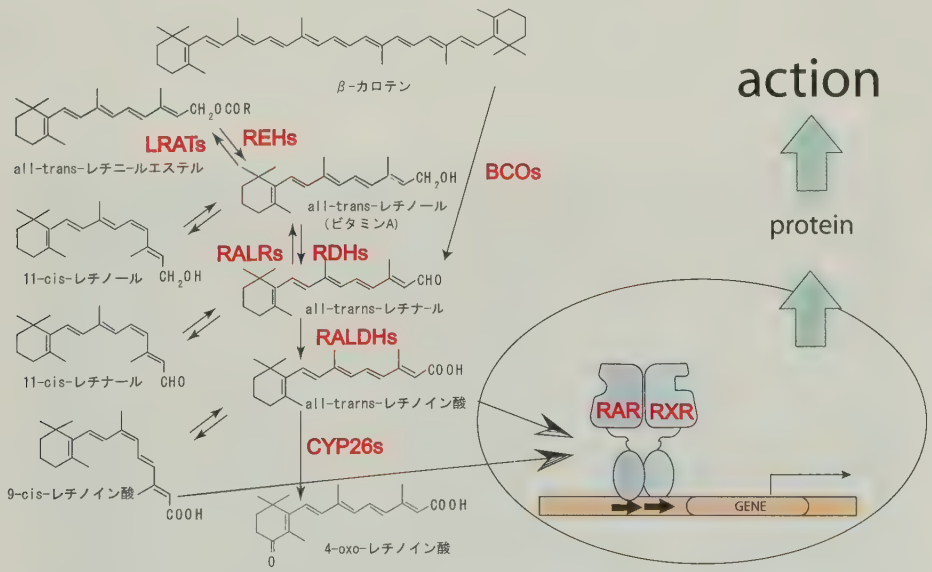


Fig.1. metabolic pathway of vitamin A. BCO, β,β-carotene-15, 15-oxygenase; CYP26, cytochrome P450, family 26; LRAT, lecithin:retinol acyltransferase; RALDH, retinaldehyde dehydrogenase; RALR, Retinal reductase; RAR; retinoic acid receptor; RDH, retinol dehydrogenase; REH, retinyl ester hydrolases; RXR; retinoid X receptor

ンボメアという分節構造があり、その分節構造と一致してHox遺伝子という転写因子ファミリーの規則的な発現がみられる。すなわち、発現するHox遺伝子の種類がロンボメアの領域特異性を決定している。領域特異的に発現するこれらの転写因子は、胚発生の初期に位置情報を担うシグナル分子により発現が活性化される。そのシグナル分子として働くのがRAである（Niederreither et al. 2000）。ゼブラフィッシュにおいてもRAや4-diethylamino-benzaldehyde（DEAB）というRA合成を阻害する試薬の浸潤実験から後脳のパターニングにRAが関与していることが示されている（Maves et al. 2005）。また、ゼブラフィッシュにおいてraldh2やRAを不活性型に変換する酵素の一つであるcytochrome P450, family 26a（cyp26a）のミュータント解析などからも後脳において前後軸パターニングにビタミンAが必須であることが示されている（Begemann et al. 2001; Grandel et al. 2002; Emoto et al. 2005; Maves et al. 2005; Hernandez et al. 2007）。その他、魚類胚発生においてRAは顔面の骨格および筋肉の発生、胸鰭形成、体節の左右対称性形成に重要な役割を果たしている（Begemann et al. 2001; Grandel et al. 2002; Kawakami et al. 2005; Gibert et al. 2006）。

RA以外のビタミンAの生理作用としてはレチナールの視覚での作用がある。ビタミンAの活性本体であるRAへの代謝中間産物のアルデヒド体であるレチナールは、視覚作用ではall trans retinalが11-cis retinalに異性化され、つぎに視細胞中オプシンと結合し、光感受性のロドプシンとなる。光によってロドプシン上の11-cis retinalからall trans-retinalに瞬時に異性化され、ロドプシンを活性化させる。活性化したロドプシンは一連の酵素反応を引きおこし、視興奮を神経に伝える。ビタミンAが欠乏すると夜盲症になる

トラフグRaldh2の分子生物学

我々は本プロジェクトを通じて全ゲノム塩基配列が公開されているトラフグから、ビタミンA代謝関連遺伝子のうちLRATを2種類、RALDHを2種類、CYP26を3種類、RARを5種類、RXRを4種類同定した。これらの発現パターンを解析することで、いつどこでRAが合成され、いつどこで分解され、どこに作用するのか、どこで貯蓄型になるのかを余すことなく推測することができる。哺乳類にはRAを合成するRALDHは3種類知られているが、ミドリフグ、トラフグ、ゼブラフィシュのどのゲノム上にも2種類しか存在しなかった。魚類ではRALDH遺伝子は2種類しかないようである。トラフグraldh2は502アミノ酸を持つ酵素で、ヒトやマウスとの同一性はそれぞれ77.2%および77.4%である（Uji et al. 2006）。Whole mount in situ hybridization法により胚における発現パターンを調べたところ、トラフグraldh2は胚発生時には様々な器官で発現しており、トラフグraldh3はほぼ眼でのみ、その発現が認められた（Fig. 2）。つまりraldh2がトラフグ胚発生における器官形成過程でRAを合成する主な酵素であると考えられた。我々はヒラメからもraldh2, raldh3遺伝子を同定し、発現パターンを解析した（宇治ら、未発表）。その結果、同様にraldh2が胚発生においてRAを合成する主な酵素であることが示唆された。我々はこれらのraldh2の発現パターンを様々な魚種で解析し、その魚種で形態異常が生じるパターンを比較することにより、ビタミンAと形態異常の関連が見えてくると考えている。

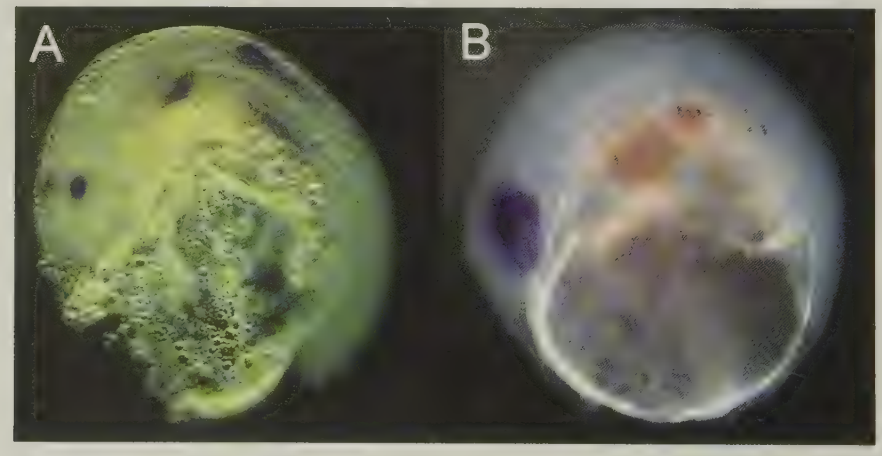


Fig. 2. Expression pattern of *Takifugu rubripes raldh2* (A) and *raldh3* (B) by whole-mount in situ hybridization.

おわりに

今後、すべてのビタミンA関連遺伝子の発現解析を行い、海産魚類初期発生でのビタミンAの役割を解明していくことが重要である。さらに、親魚飼料のビタミンA含量の違いと卵内ビタミンA含量との関係及び、卵内ビタミンA含量と形態異常の関係を調べていく必要がある。また、最近ビタミンAの新たな展開があった。レチナールの眼以外での役割がZiouzankovaらによって初めて報告された(Ziouzenkova et al. 2007)。それによると脂肪組織中のレチナールは、脂肪の貯蔵や動態をコントロールすると考えられる peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) のアンタゴニストとして作用し、脂肪細胞分化を抑制しているらしい。これはビタミンA代謝を調節することにより、脂肪形成を制御できる可能性を示唆する発見であり、「脂ののった魚を育てる」という養殖への応用が期待される。

文　献

Begemann G., Schilling T.F., Rauch G.J., Geisler R., and Ingham P.W., 2001: The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for raldh2 in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development*, **128**, 3081-3094.

Chambon P., 1996: A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb. J.*, **10**, 940-954.

Clagett-Dame M., and DeLuca H.F., 2002: The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu. Rev. Nut.r*, **22**, 347-381.

Costaridis P., Horton C., Zeitlinger J., Holder N., and Maden M., 1996: Endogenous retinoids in the zebrafish embryo and adult. *Dev. Dyn.*, **205**, 41-51.

Dedi J., Takeuchi T., Seikai T., and Watanabe T., 1995: Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed Artemia nauplii. *Aquaculture*, **133**, 135-146.

Emoto Y., Wada H., Okamoto H., Kudo A., and Imai Y., 2005: Retinoic acid-metabolizing enzyme Cyp26a1 is essential for determining territories of hindbrain and spinal cord in zebrafish. *Dev. Biol.*, **278**, 415-427.

Gibert Y., Gajewski A., Meyer A., and Begemann G., 2006: Induction and prepatterning of the zebrafish pectoral fin bud requires axial retinoic acid signaling. *Development*, **133**, 2649-2659.

Grandel H., Lun K., Rauch G.J., Rhinn M., Piotrowski T., Houart C., Sordino P., Kuchler A.M., Schulte-Merker S., Geisler R., Holder N., Wilson S.W., and Brand M., 2002: Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud. *Development*, **129**, 2851-2865.

Haga Y., Suzuki T., Kagechika H., and Takeuchi T., 2003: A retinoic acid receptor-selective agonist causes jaw deformity in the Japanese flounder, Paralichthys olivaceus. *Aquaculture*, **221**, 381-392.

Hernandez R.E., Putzke A.P., Myers J.P., Margaretha L., and Moens C.B., 2007: Cyp26 enzymes generate the retinoic acid response pattern necessary for hindbrain development. *Development*, **134**, 177-187.

Irie T., and Seki T., 2002: Retinoid composition and retinal localization in the eggs of teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mo.l Biol.*, **131**, 209-219.

Kaiser M.E., Merrill R.A., Stein A.C., Breburda E., and Clagett-Dame M., 2003: Vitamin A deficiency in the late gastrula stage rat embryo results in a one to two vertebral anteriorization that extends throughout the axial skeleton. *Dev. Biol.*, **257**, 14-29.

Kawaguchi, R., Yu, J., Honda, J., Hu, J., Whitelegge, J., Ping, P., Wiita, P., Bok, D., and Sun, H., 2007: A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science*, **315**, 820-825.

Kawakami Y., Raya A., Raya R.M., Rodriguez-Esteban C., and Belmonte J.C., 2005: Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo. *Nature*, **435**, 165-171.

Lammer E.J., Chen D.T., Hoar R.M., Agnish N.D., Benke P.J., Braun J.T., Curry C.J., Fernhoff P.M., Grix A.W., Jr., Lott I.T., et al., 1985: Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med*, **313**, 837-841.

Maden M., Gale E., Kostetskii I., and Zile M., 1996: Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr. Biol.*, **6**, 417-426.

Maves, L., Kimmel, C.B., 2005: Dynamic and sequential patterning of the zebrafish posterior hindbrain by retinoic acid. *Dev. Biol.*, **285**, 593-605.

Morriss-Kay G., 1992: Retinoic acid and development.

Pathobiology, **60**, 264-270.

Niederreither K., Vermot J., Schuhbaur B., Chambon P., and Dolle P., 2000: Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development*, **127**, 75-85.

Shenefelt, R.E., 1972: Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology*, **5**, 103-118.

Silverman A.K., Ellis C.N., and Voorhees J.J., 1987: Hypervitaminosis A syndrome: a paradigm of retinoid side effects. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **16**, 1027-1039.

Takeuchi T., Dedi J., Haga Y., Seikai T., and Watanabe, T., 1998: Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) . *Aquaculture*, **169**, 155-165.

Uji S., Suzuki T., and Kurokawa T., 2006: Molecular cloning and expression of retinoic-acid synthesizing enzyme raldh2 from *Takifugu rubripes*. *Comp. Biochem. Physio. D: Genomics and Proteomics*, **1**, 133-138.

White J.C., Highland M., Kaiser M., and Clagett-Dame M., 2000: Vitamin A deficiency results in the dose-dependent acquisition of anterior character and shortening of the caudal hindbrain of the rat embryo. *Dev. Biol.*, **220**, 263-284.

Ziouzenkova O., Orasanu G., Sharlach M., Akiyama T.E., Berger J.P., Viereck, J., Hamilton J.A., Tang G., Dolnikowski G.G., Vogel S., Duester G., and Plutzky J., 2007: Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat. Med.*, **13**, 695-702.

水研センター研報，第24号，47－52，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 47－52, 2008

報　文

魚類の初期発生期におけるサイトカイン遺伝子群の機能を探る

吉浦康寿[*1]・乙竹　充[*1]・伊藤かな子[*2]

Expression and function of cytokine genes in the early development of fish

Yasutoshi YOSHIURA[*1], Mitsuru OTOTAKE[*1], and Kanako ITO[*2]

Abstract Cytokines are a group of proteins that are involved in a variety of immunological and inflammatory reactions. Recently, it has been reported that cytokine genes also play an important role during development in mammals. In fish, however little is known about the role of immune-related genes during embryogenesis. Here, we report the expression and function of some cytokines during embryonic development in zebrafish. In RT-PCR analysis, the expression of three cytokines (MIF, IL-1 β and TNF- α 2) was detected before the development of the immune system in zebrafish embryos. Moreover, to elucidate the function of MIF during embryonic development in fish, we examined expression patterns and function of the zebrafish MIF gene using antisense morpholino-mediated knockdown (morpholino oligonucleotide-MO). In whole-mount *in situ* hybridization analysis, zebrafish MIF mRNA was detected in developing eyes, tectum, branchial arches, pectoral fin buds, liver and gut. MIF-MO-injected embryos (morphants) displayed malformed eyes, abnormal swelling in the tectum and fourth ventricle region, and undeveloped jaw cartilage and pectoral fins. An increased number of apoptotic cells in the eye and neural tissues were observed in MIF morphants. These results suggest that MIF is essential for normal embryonic development even at the level of teleost.

Key words : cytokine, Macrophage migration inhibitory factor (MIF), early development, zebrafish, morpholino

サイトカインは細胞間の情報を伝達する一群のタンパク質であり、生体防御、発生・形態形成、生殖などの生命現象の様々な場面で重要な働きをすることが知られている。近年、トラフグ、ミドリフグ、ゼブラフィッシュ、メダカ、トゲウオと次々に全ゲノムが解読され、これらの情報を利用して、魚類のサイトカイン遺伝子群の単離が急速に進み、哺乳類サイトカインと相同な一連のサイトカイン遺伝子群が魚類にも存在することが明らかになりつつある。しかしながら、魚類サイトカインの生理機能、生物学的意義については、未だ十分に明らかにされていないのが現状である。特に、初期発生期および仔稚魚期における魚類サイトカインの機能に関する報告は殆どない。また魚類に比べて研究が進んでいる哺乳類においても、個体発生が生体外で行えないため、初期発生期におけるサイトカインに関する研究は、成体に関する研究に比べて遅れている。

そこで本研究では、生体外で発生し、その過程が容易に観察でき、実験発生学に適したゼブラフィッシュをモデルとして、魚類の初期発生期におけるサイトカイン遺伝子群の発現動態および機能解析を行い、初期発生期におけるサイトカインの機能を探ることを目的とした。

2008年4月23日　受理　(Received on April 23, 2008)
[*1] 水産総合研究センター養殖研究所　〒519-0423 三重県度会郡玉城町昼田224-1 (National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research agency, Hiruta 224-1, Tamaki, Mie 519-0423, Japan)
[*2] 日本大学生物資源科学部獣医学科　〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野1866 (Department of Veterinary Medicine, College of Bio resource Sciences, Nihon University, Kameino 1866, Fujisawa, Kanagawa, 252-8510, Japan)

初期発生期に発現するサイトカイン遺伝子群の同定

まず、ゼブラフィッシュのゲノムデータベースを用いて、サイトカイン遺伝子群のBLASTサーチ等のホモロジー検索およびシンテニー解析を網羅的に行い、多くのサイトカイン遺伝子を*in silico*で同定した。それらの情報を基に、一連のサイトカイン遺伝子群の中でも、炎症性サイトカイン群を中心に、各サイトカイン遺伝子を特異的に増幅するプライマーを設計し、RT-PCRを確立した。次に、これらのRT-PCR法を用いて、初期発生期におけるサイトカイン遺伝子群の発現パターンを調べた。その結果、初期発生期におけるサイトカイン遺伝子群は、以下の4つの発現パターンに分類された。発現パターン①は卵割期から幼生期まで恒常的に強い発現が認められるもの（macrophage migration inhibitory factor: 以下MIF）(Fig.1A)、発現パターン②は卵割期、胞胚期に強い発現が認められるが、その後、発現が弱くなるもの（IL-1 β）(Fig.2)、発現パターン③は卵割期には発現が認められないが、胞胚期後期から原腸胚期に強く発現し、その後発現が弱くなるもの（TNF-α 2) (Fig.2)、発現パターン④は初期発生期において明瞭な発現が認められないもの（TNF-α 1, Type1 IFN, IFN-γ, IL-12p35, IL-12p40, FasL）（データ未掲載）であった。以上のことから、初期発生期において明瞭な発現が確認されるサイトカインは、MIF、IL-1 β、およびTNF-α 2の3つであることが明らかになった。その中でも、MIFは、初期発生期を通じて恒常的に強い発現が認められることから、初期胚において重要な役割を果たすことが予想された。またMIF遺伝子の成体での発現を調べた結果、調べたすべての器官で強い発現が認められた(Fig.1A)。

初期発生期におけるMIF遺伝子の発現動態解析

RT-PCRの結果から、初期発生期においてMIFが強く発現することが明らかになったが、初期胚における発現部位および時期の詳細は不明である。そこで、初期発生期におけるMIFの機能を探るために、MIF遺伝子の初期胚における発現部位および時期をwhole mount *in situ* hybridization (WISH)を用いて、より詳細に調べた。その結果をFig.1Cに示す。MIF mRNAは、第一卵割期から胞胚期には、検出されなかった（データ未掲載）が、中期原腸胚期（受精後5時間）には胚全体に弱い発現が認められた（Fig.1C(i)）。さらに受精後14時間の体節期になると、胚全体の弱い発現に加えて、眼の原器での局所的な発現が観察された（Fig.1C(iii)）。受精後19時間になると、眼での発現はより強くなり、さらに中脳での発現も認められた（Fig.1C(v)）。受精後24時間では、眼領域と頭部神経系（中脳、小脳および菱脳）での発現が認められた（Fig.1C(vii)）。受精後48時間では、それまでの器官に加えて、鰓（咽頭弓）および胸鰭での発現が観察された（Fig.1C(ix and xi)）。さらに、この時期の眼について組織切片を作製して調べた結果、眼でのMIFの発現は、網膜の幹細胞が存在する分裂が盛んな領域（ciliary marginal zone: CMZ）であった(Fig.1C(xv))。受精後72時間では、眼領域と頭部神経系に加えて、新たに肝臓、消化管での発現が認められた（Fig.1C(xiii)）。以上のことから、MIF遺伝子は、眼、頭部神経系、鰓および胸鰭の各器官が形成される初期に発現することが明らかになった。

初期発生期におけるMIF遺伝子の機能解析

初期発生期におけるMIFの機能を解析するために、モルフォリノオリゴ（MO）によるMIF遺伝子のノックダウン（翻訳阻害）を行った。MIFのmRNAに対する3種類のアンチセンスMOを作製し、1-4細胞期の受精卵の細胞質に顕微注入した。3種類のMO注入胚ともほぼ同様な表現型を示したが、3種類のMOの中で、MO3が最も効率よく異常な表現型（注入胚の66%）を誘導することができた（Table 1）。そこで、以後の翻訳阻害実験はすべてMO3を用いて行った。MO注入胚における異常は、受精後36時間後に初めて観察され、その表現型は、さらに顕著になった。受精後36時間においては、中脳蓋と第4脳室が肥大し、菱脳が萎縮した（Fig.3(ii)）。受精後48時間では、中脳蓋はさらに肥大化し、頭部および眼部は小さく、体全体が彎曲した胚が多く観察された（Fig.3(iv and vi)）。受精後3日では、これまでの異常はさらに顕著になるとともに、胸鰭および顎の形成不全が認められた（Fig.3(vii, x and xii)）。その後、MO注入胚は、数日生存するが、受精後7日までには、すべて死亡した。以上のことから、MIF遺伝子は、魚類初期発生期において眼、頭部神経系、顎および胸鰭の器官形成に必須であることが明らかとなった。

次に、眼、頭部神経系、顎および胸鰭の器官形成おいて、MIFがどのような役割を果たしているのかを解明するために、MIF遺伝子の翻訳阻害がアポトーシスおよび細胞増殖に及ぼす影響を調べた。アポトーシス検出は、MO注入胚をアクリジンオレンジ染色し、蛍光顕微鏡観察によりアポトーシスを検出した。その結果、MO注入胚では、形成不全を示す眼、頭部神経系

において顕著なアポトーシスが検出された（Fig.4A）。従って、MO 注入により MIF の発現が抑制されると本来の発現部位でのアポトーシスが誘導されると推察された。また、proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体により増殖細胞を免疫組織学的に調べた結果、MO 注入胚の眼では、PCNA 陽性細胞が減少していた（Fig.4B）。以上のことより、MIF は初期発生期の器官形成において成長因子として機能することが示唆された。

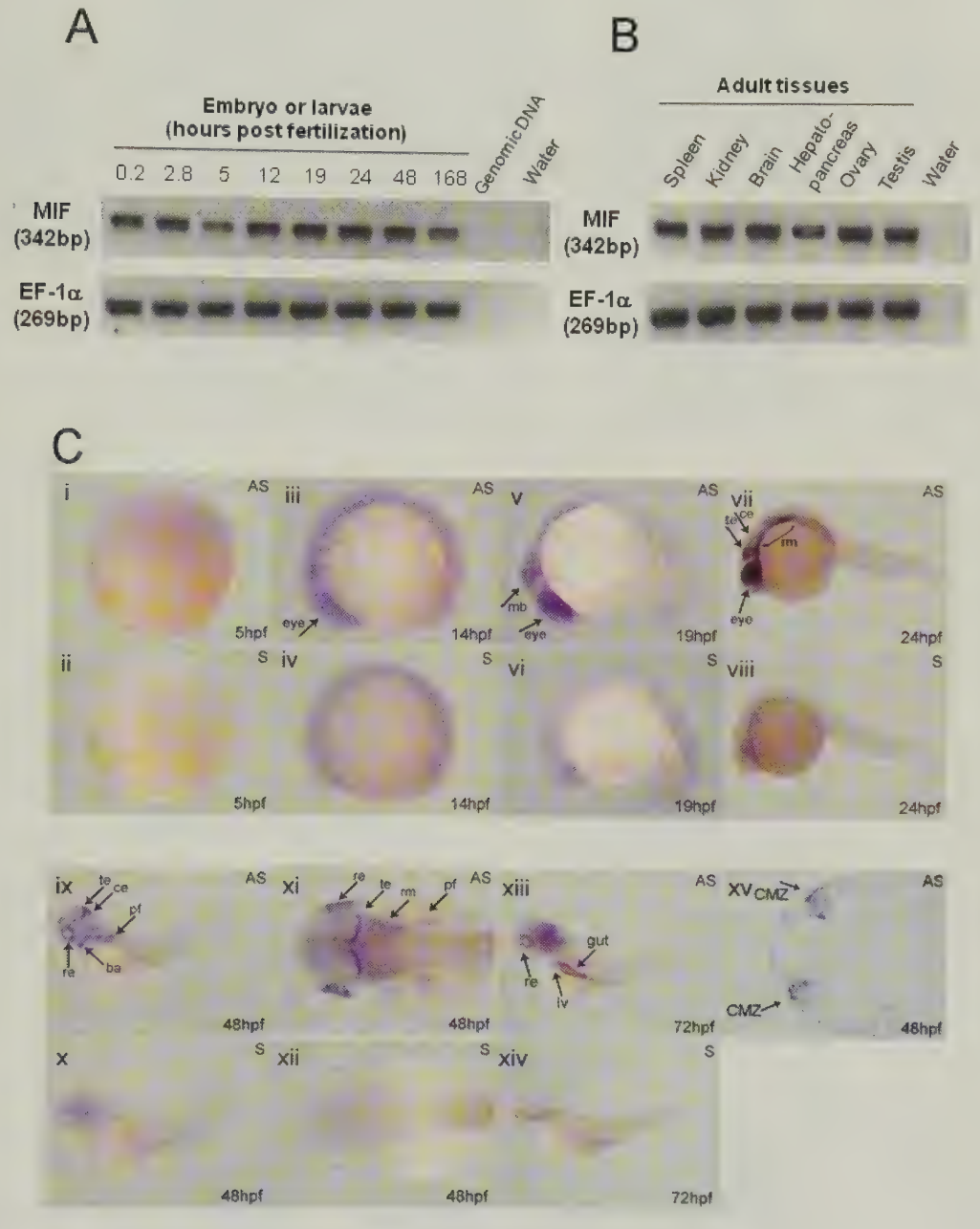


Fig. 1. Temporal and spatial expression patterns of zebrafish MIF mRNA. (A) RT-PCR results from various stages of embryos and larvae. (B) RT-PCR results from different adult tissues. Molecular weight markers and a control PCR reaction lacking DNA template are shown in the first and last lanes, respectively. EF-1a is used as a control for cDNA synthesis. Genomic DNA was also used as a control for genomic contamination during the RT-PCR procedure. Amplified zebrafish MIF and EF-1a are 342 and 269 bp, respectively. (C) In situ hybridization reactions of embryos and larvae: Whole-mount embryos or larvae at 5 hpf (i, ii), 14 hpf (iii, iv), 19 hpf (v, vi), 24 hpf (vii, viii), 48 hpf (ix–xii) and 72 hpf (xiii, xiv). Lateral views with anterior to the left (i–x, xiii, xiv). Dorsal views with anterior to the left (xi, xii). Frontal sections of 48 hpf embryos at the level of the eye (xv). Abbreviations: ba, branchial arches; ce, cerebellum; CMZ, ciliary marginal zone; lv, liver; mb, midbrain; pf, pectoral fins; re, retina; rm, rhombomere; te, tectum; AS, antisense probe; S, sense probe. (From Ito *et al.*, 2008a)

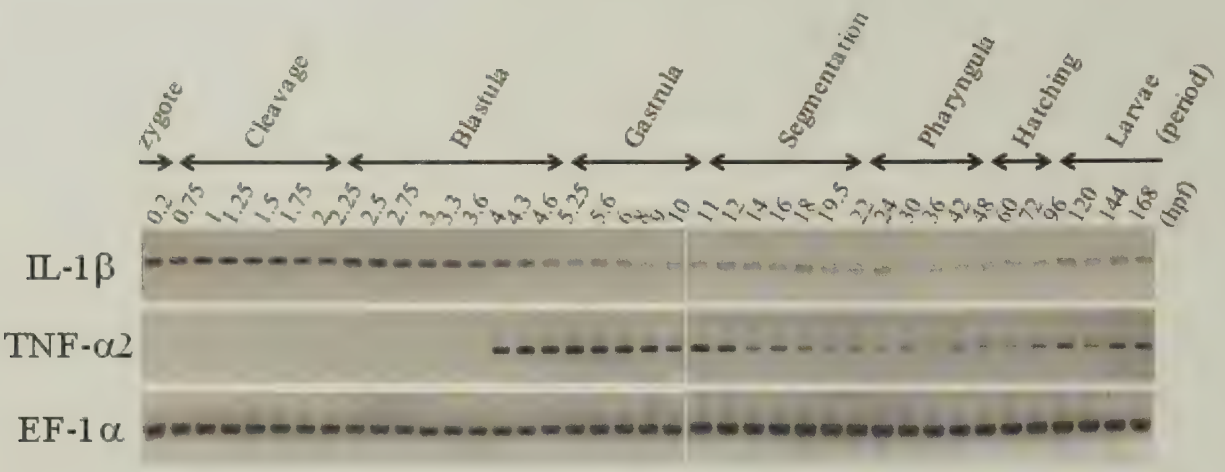


Fig.2. Expression of IL-1 β and TNF- α 2 mRNAs during embryonic zebrafish development. RT-PCR results from various stages of embryos and larvae. The developmental stages examined were as follows: 0.2 (hpf) (zygote period), 0.75 hpf to 2 hpf (cleavage period), 2.25 hpf to 4.6 hpf (blastula period), 5.25 hpf to 10 hpf (gastrula period), 11 hpf to 22 hpf (segmentation period), 24 hpf to 42 hpf (pharyngula period), 48 hpf to 72 hpf (hatching period) and 96 hpf to 144 hpf (early larval period). hpf represents hours post fertilization. (From Ito *et al.*, 2008b)

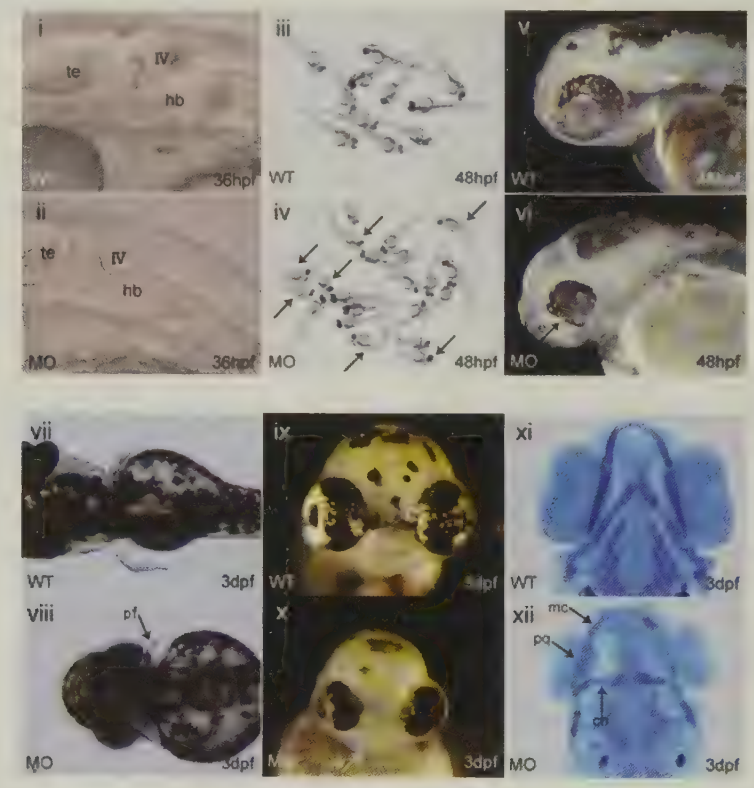


Fig.3. MIF-knockdown phenotypes in zebrafish. Morphology of wild-type embryos (WT) and MIF morphants (MO) observed at the times indicated. Lateral views with anterior to the left (i, ii, v, vi). Dorsal views with anterior to the left (vii, viii). Frontal views with dorsal to the top (ix, x). Ventral views with anterior to the top (xi, xii). At 48 hpf, morphants have a slightly smaller head than wild-type and curled tail (iv; arrow), small eyes (vi; arrow). At 3 dpf, morphants lack normal pectoral fins (viii; arrow) and jaws (x; arrow). Three dpf larvae stained with alcian blue (xi, xii). Abbreviations: ch, ceratohyal; e, eye; hb, hindbrain; jw, jaw; mc, Meckel's cartilage; pf, pectoral fins; pq, palatoquadrate; te, tectum; IV, the fourth ventricle. (Modified from Ito *et al.*, 2008a)

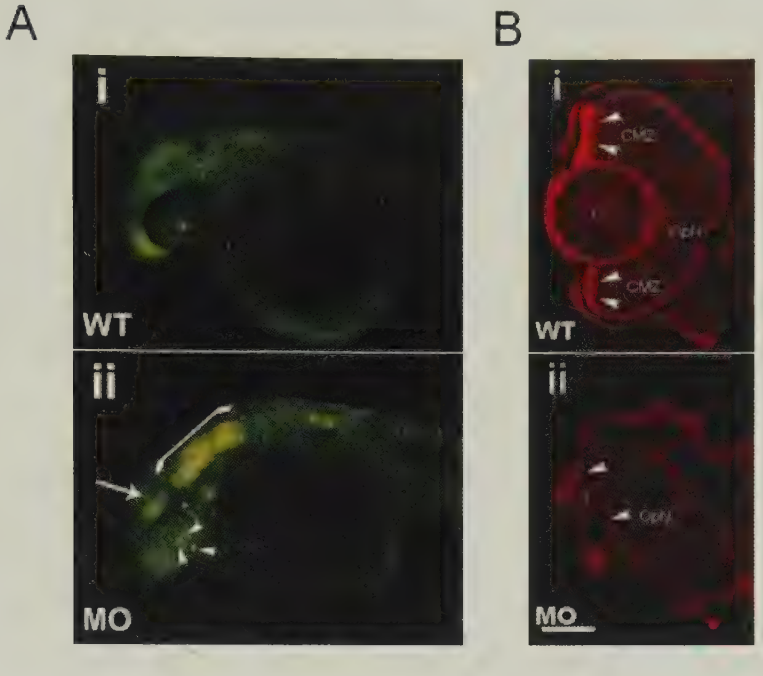


Fig. 4. Comparison of apoptotic cells and proliferative cells between morphants and wild-type embryos. (A) Detection of apoptosis in MIF morphants. Wild-type embryos (i) and MIF morphants (ii) at 36 hpf are stained with acridine orange. Lateral views with anterior to the left. Excess cell death is detected in the eyes (arrow heads), tectum (arrow) and hindbrain region (bracket) in MIF morphants. (B) Comparison of proliferative cells between morphant and wild-type eyes. PCNA-positive cells are detected at the retinal margin of a wild-type eye at 5 dpf (i; arrow heads), while few signals are detected in the morphants (ii; arrow heads). Frontal views with dorsal to the top. Abbreviations: CMZ, ciliary marginal zone; OpN, optic nerve. The scale bars indicate 50 mm. (Modified from Ito *et al.*, 2008a)

Table 1 Effects of morpholino-mediated knockdown of zebrafish MIF (From Ito *et.al.*, 2008a).

Morpholino oligos	Total embryos	No. (%) of embryos with normal or abnormal phenotypes		
		Normal	abnormal	lethal
MO1	331	182 (55)	72[a] (22)	77 (23)
MO2	881	380 (43)	308 (35)	193 (22)
MO3	915	76 (8)	602 (66)	237 (26)
Control morpholino*	69	64 (93)	0 (0)	5 (7)

[a] Number of embryos with abnormal phenotypes, i.e., abnormal swelling in the tectum region, small malformed eye at 48 hpf (see Fig.3). * :control morpholino is relative to MO2.

おわりに

本研究によって、魚類の初期発生期におけるサイトカイン遺伝子群の機能の一端を明らかにすることができた。初期発生期において発現するサイトカイン遺伝子群を網羅的に調べた結果、3種類の炎症性サイトカイン（MIF、IL-1 β、およびTNF- α 2）が、初期発生期において発現することが明らかになった。その中で、初期発生期を通じて恒常的に強い発現が認められるMIFに関しては、WISHによる詳細な発現解析の結果、眼、頭部神経系、鰓および胸鰭の各器官が形成される初期に発現することが明らかになった。さらに、MOによるMIF遺伝子の翻訳阻害により、MIFが発現する各器官において形成不全が誘導された。以上のことから、MIF遺伝子は、魚類初期発生期において眼、頭部神経系、顎および胸鰭の器官形成に必須であることが明らかとなった。

一方、MIF以外のサイトカイン遺伝子の機能の解明に関しては、十分な成果を得るには至らなかった。その原因としては、MOは発生のごく初期に機能する遺伝子については有効であるが、発生の後期やそれ以降のステージで機能する遺伝子のついては、機能を阻害することができないことが挙げられる。当然、稚魚や成魚における機能も阻害することはできない。この問題を克服する遺伝子機能解析法として、遺伝子破壊（ノックアウト）が最も有効な手段であるが、脊椎動物で遺伝子破壊ができるのはマウスだけであった。しかし、近年、魚類でも遺伝子破壊実験系がゼブラフィッシュ（Wienholds *et al.*, 2002）およびメダカ（Taniguchi *et al.*, 2006）で確立され、魚類でも遺伝子破壊が可能になった。現在、メダカの遺伝子破壊実験系を確立した京都大学のグループと共同研究により、サイトカイン遺伝子のノックアウトメダカの作製を試みている。今後、各種のサイトカインおよび免疫関連遺伝子について、ノックアウト個体を作製することにより、魚類の免疫系や生体防御機能の初期発生機構の解明が飛躍的に進展することが期待される。

文　献

Ito K., Yoshiura Y., Ototake M., and Nakanishi T., 2008a: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is essential for development of zebrafish, *Danio rerio*. *Dev. Comp. Immunol.*, 32:664-672.

Ito K., Takizawa F., Yoshiura Y., Ototake M., and Nakanishi T., 2008b: Expression profile of cytokine and transcription factor genes during embryonic development of zebrafish, *Danio rerio* *Fisheries Sci.*, 74:391-396.

Taniguchi Y., Takeda S., Furutani-Seiki M., Kamei Y, Todo T., Sasado T., Deguchi T., Kondoh H., Mudde J., Yamazoe M., Hidaka M., Mitani H., Toyoda A., Sakaki Y., Plasterk RH., and Cuppen E., 2006: Generation of medaka gene knockout models by target-selected mutagenesis. *Genome Biol.*, 7(**12**):R116.

Wienholds E., Schulte-Merker S., Walderich B., and Plasterk RH., 2002: Target-selected inactivation of the zebrafish rag1 gene. *Science*. **297**(5578):99-102.

水研センター研報，第24号，53－61，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 53－61, 2008

報　文

魚類の食欲を制御する分子機構を探る
～フグゲノム情報を利用したleptinおよびagoutiの同定～

黒川忠英*

Appetite control systems in fish
- Identification of fish leptin and agouti-family genes -

Tadahide Kurokawa *

Abstract To understand the regulation systems of appetite in fish, we identified cDNA coding for leptin and agouti family proteins in pufferfish (*Takifugu rubripes*). The Takifugu leptin was found using genomic synteny around the human leptin gene as a first non-mammalian leptin gene. The Takifugu leptin mRNA was expressed in the liver that contained abundant lipids. In addition, the homologues to *Takifugu* leptin for some fish and amphibians were found in the databanks. The phylogenetic analysis shows rapid rates of molecular divergence among leptins from different vertebrate classes. *Takifugu* has four types of agouti-family genes (*AGRP1, AGRP2, ASIP1* and *ASIP2*). The *Takifugu ASIP1* expression level was about five times higher in the white ventral skin than in the black dorsal skin. This indicates that the *Takifugu* ASIP1 functions to retain the dorsal-ventral pigmentation pattern like to mammalian ASIP. On the other hand, *ASIP2, AGRP1* and *AGRP2* mRNA expression were detected in various organs in *Takifugu*. Therefore, the physiological functions of melanocortins and agouti-family proteins seem to be more complex in fish than in mammals.

Key words : leptin, agouti, AGRP, Takifugu

ほ乳類においては、ヒトの肥満という社会的関心の高さから、食欲制御の分子機構に関しての研究が進んでいる。この食欲制御の分子機構に関してエポックメーキングとなったのが，レプチンというホルモンの発見である。この発見は，それまでエネルギー貯蔵のみと考えられていた脂肪細胞が，ホルモンを産生・分泌する内分泌器官でもあり，また，脂肪組織量をコントロールする液性因子があるというという新たな概念を提起した。それ以降，脂肪細胞からはアディポネクチンなどエネルギー代謝に関与する新たな生理活性物質が発見されている(Scherer *et al.* 1995)。レプチンは、Zhangら(1994)によって遺伝性肥満(ob/ob)マウスの病因遺伝子として同定された。この肥満遺伝子産物は、強力な摂食抑制と肥満制御作用を有し、ギリシャ語の“leptos”（やせ）にちなんで“レプチン”(leptin)と命名された。

レプチンは、白色脂肪細胞から分泌され、脳の視床下部にある食欲中枢(Arcuate nucleus)に作用することにより、摂食抑制と脂肪分解、褐色脂肪細胞における熱産生をもたらすホルモンである（Fig.1)。食欲中枢では、レプチンはレプチン受容体を介して、食欲の促進的に働くneuropeptide Y (NPY) ニューロンと抑制的に働くα-melanocyte-stimulating hormone (α-MSH)ニューロンに作用している(Horvath et al. 2001; Wynne *et al.* 2005)。NPYニューロンには、α-MSHの内因性アンタゴニストであるAgouti related protein (AGRP)が存在し、食欲促進時にはNPYニューロンの活性化と同時にAGRPによるα-MSHニューロンの抑制が行われると考えられている(Broberger *et al.* 1998)。皮膚で発現している類似のagouti-signaling

2008年4月23日　受理　(Received on April 23, 2008)
*水産総合研究センター養殖研究所　〒516-0193　三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1 (National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, 422-1, Nakatsuhama, Minamiise, Watarai, Mie, 516-0193, JAPAN)
現所属：水産総合研究センター東北区水産研究所　〒985-0001　宮城県塩釜市新浜町3-27-5 (Tohoku National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, 3-27-5, Shinhama, Shiogama, Miyagi, 985-0001, JAPAN)

protein (ASIP) は、やはり遺伝性肥満 (yellow agouti) マウスの病因遺伝子として同定されている (Miller *et al.* 1993)。一方、α-MSH ニューロンには cocain- and amphetamine-regulated transcript (CART) が共存し、食欲抑制に機能していると考えられている (Elias *et al.* 1998)。さらに、レプチンとは拮抗的な働きを持つグレリンというホルモンが発見されている。最初グレリンは、胃から分泌される成長ホルモン分泌刺激ホルモンとして、Kojima ら (1999) により同定された。その後、グレリンには食欲促進作用もあることが明らかになった　やはりグレリンも食欲中枢において、グレリン受容体 (GHS-R) を介して NPY ニューロンに作用していると考えられている (Tamura *et al.* 2002; Wang *et al.* 2002)。つまり、脂肪細胞から分泌されるレプチンが、体のエネルギーの蓄積状態を神経系に伝える因子として、また胃から分泌されるグレリンが体の空腹状態を神経系に伝える因子として機能しているのである。

マダイやヒラメなど一部の魚種では選抜育種により高成長系統などが作出されつつあり、このような高成長群では無選抜群よりも摂餌量が多い事が知られている。しかし、このような形質がどのような遺伝子によってもたらされているかは明らかにされていない。グレリンは、本バイオデザインプロジェクトが開始される時点で、すでに数種の魚類から同定されていた (Kaiya et al. 2003; Kaiya *et al.* 2003; Kaiya *et al.* 2003)。しかし、レプチンはほ乳類以外の脊椎動物からは同定されていなかった。変温動物である魚類は、食欲やエネルギーの蓄積機構がほ乳類とは異なると予想されることから、魚類におけるレプチンや Agouti などの食欲制御因子の生理機能を明らかにすることは、魚類養殖技術の高度化に重要であると考えられた。

レプチン

魚類においても、レプチンの存在を示唆する報告がいくつかなされていた (Johnson *et al.* 2000; Muruzábal *et al.* 2002; Vegusdal *et al.* 2003)。これらはいずれも、哺乳類レプチンに対する抗体を用いて、免疫化学的に組織や血清中に免疫陽性反応を示す因子を検出したものであった。しかし、分子に関する情報は全く得られていなかった。

近年、生物の遺伝子情報の蓄積が進み、魚類においてもトラフグ (*Takifugu rubripes*) を初めとして数種の全ゲノムの塩基配列の決定がなされてきた。このような遺伝子情報を利用し、多くの研究グループが、魚類のレプチン遺伝子をほ乳類のレプチン遺伝子との相同性から特定しようと試みたが、いずれもうまくいっていなかった。このことから、魚類にレプチンが存在するとしても、ほ乳類のレプチンとは相同性がきわめて低いと考えられた。

そこで我々は、ヒトのレプチン遺伝子周辺のゲノム上の遺伝子の並び方に相同性を持ったゲノム領域が、トラフグゲノム上に存在するかどうかを解析した。ヒトのレプチン遺伝子は7番染色体の q31 にマップされ、その周りには RBM28, LRRC4, Pax4 などの遺伝子が分布している。これらレプチン周辺の遺伝子に相当する遺伝子をフグゲノム上で探索したところ，類似した遺伝子の並び方をしている領域が 2 カ所 (scaffold 12 and 866, JGI Ver.3) 見いだされた (Fig.2a)。このように遺伝子が重複して存在するのは、硬骨魚類の進化の過程でゲノムが倍加したことに由来すると推察された (Amores et al. 1998; Taylor *et al.* 2003)。したがって、レプチン遺伝子がトラフグにもあるとすれば、このゲ

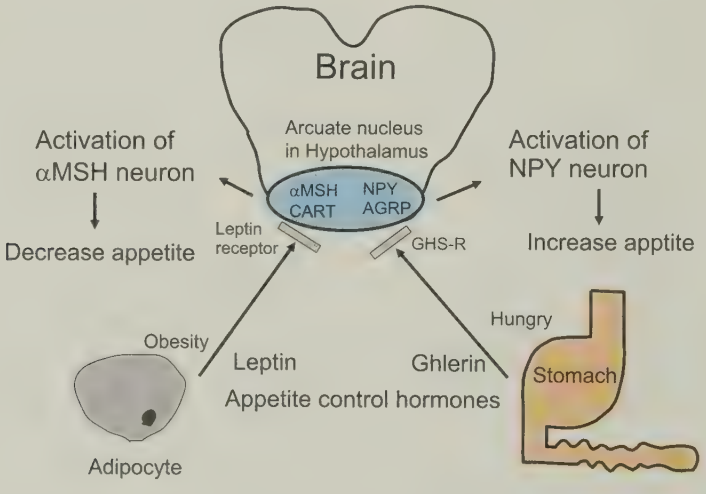


Fig. 1. The model of central regulation of daily energy homeostasis and their relationship to peripheral and putative hypothalamic ghrelin and leptin (review in Horvath *et al.*, 2001).

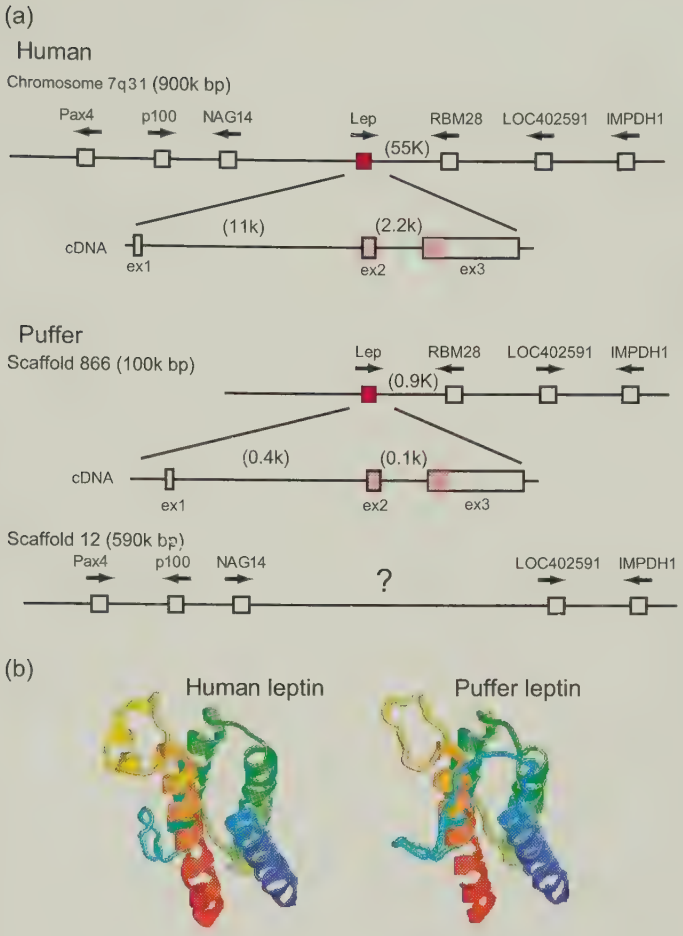


Fig. 2. Comparison of leptin gene characterization between human and *Takifugu*. (a) The gene arrangement and the cDNA structure of leptin gene. Arrows indicate the direction of transcription of the genes. Shaded areas indicate open reading frame. GenBank accession nos. : Pax4, NM_006193; SND1, NM_014390; NAG8, NP_055226; LRRC4, NM_022143; RBM28, NP_060547; LOC401339, XP_379517; IMPDH1, NP_000874 . (b) Ribbon diagram showing the tertiary structure of human and puffer leptin. Secondary and tertiary protein structures were modeled using the ProModII program at the SWISS-MODEL automated protein modeling server, based upon human leptin (1AX8.pdb) Protein Data Bank structure file. (Modified from Kurokawa *et al.*, 2005).

ノム領域に存在する可能性が高いと考えられた。

そこで、このゲノム領域に存在する未同定の遺伝子を、Genscan プログラム（http://genes.mit.edu/GENSCAN.html）により予測した。その結果、Scaffold 866 の RBM28 遺伝子の近傍に、レプチンと類似した遺伝子構造を持つ遺伝子が予測された。これが、実際に発現している遺伝子か否かを確認するため、このゲノム情報を元にプライマーを設計し、トラフグ稚魚の体全体の cDNA をテンプレートとした RT-PCR を行った。予想通りの PCR 産物が得られたことから、3’および 5’ RACE PCR 法を用いて、この遺伝子の cDNA 全長の塩基配列を決定した。この遺伝子は、152 アミノ酸をコードする翻訳領域を含む 791bp の塩基対から成っていた。また、トラフグゲノム情報から、この遺伝子はヒトレプチン遺伝子と同様に 3 つのエクソンから構成されていることが明らかになった（Fig.2a）。このトラフグの遺伝子がコードするアミノ酸配列は、ヒトレプチンと比較して 13.2% の相同性しか認められなかった。しかし、ほ乳類レプチンの間で保存されている SS 結合を形成するための 2 カ所のシステインの位置は保存されていた。さらに、タンパク質の立体構造 を SWISS-MODEL（http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html）によって予測したところ、4 本のアルファヘリックス構造を持つヒトレプチンに非常によく似た構造を持つことが明らかになった（Fig. 2b）。これらのことから、我々はこの遺伝子がトラフグのレプチン遺伝子であると結論づけた（Kurokawa *et al.* 2005）。

トラフグレプチン遺伝子の組織発現パターンを解析した結果、肝臓で強い発現が認められた（Fig. 3）。ほ乳類レプチンは、先に示したように主に脂肪細胞で発現している遺伝子である。しかし、フグ科魚類は明瞭

な脂肪組織を持たず，脂肪の大部分を肝臓に蓄積している（Akiyoshi and Inoue 2004）。フグの肝細胞は、細胞内に大量の油滴を蓄えた脂肪細胞と類似した構造を持っている。今回得られた遺伝子は，フグの肝細胞の細胞質で特異的に発現していたことから，やはり脂肪細胞と関連していると推察された。

トラフグレプチンのアミノ酸配列を基に、遺伝子データーベースを検索した結果、ミドリフグ、メダカ、大西洋サケなどのレプチン遺伝子を同定するとともに、サンショウウオやアフリカツメガエルのなどの両生類のレプチン遺伝子まで同定することができた（Fig.4）。これらのことから、レプチン遺伝子は広く脊椎動物に保存されている遺伝子であることが明らかになった。レプチンのアミノ酸配列を基に分子系統樹を作成すると、近縁なトラフグとミドリフグ間でも48%の相同性しか認められず、魚類間（18-48%の相同性）ではほ乳類間（80%以上の相同性）に比べて非常に相同性が低いことが明らかになった。一方、原始的な硬骨魚類とされるサケ科魚類のレプチンの方がより両生類のレプチンに近い傾向が見られた。これらのことは、レプチンが魚類の進化の過程で非常に大きく変異してきた分子であることを示していると考えられる。（分子系統樹の中に鳥類のレプチンを記載しているが、マウスレプチンと塩基レベルで97%以上の相同性を示すことや、ニワトリゲノム中に相当する配列が認められないなど、報告の再現性が疑問視されているので（Doyon *et al*. 2001）、括弧書きで記載した。）

我々の報告後、サンショウウオ（Boswell *et al*. 2006）やコイ（Huising *et al*. 2006）のレプチンに関する報告がなされている。コイにおいては、非常に相同性の高い2種類のレプチン遺伝子が同定されている。コイでは、初めて魚類の生理状態とレプチン遺伝子の発現との関連について報告がなされたが、leptin遺伝子の肝臓における発現は短期・長期的な絶食状態に対しても変化は認められていない。

我々も、魚類におけるレプチンの生理機能を探るため、給餌試験などが容易なニジマスからレプチン遺伝子をクローニングした。ニジマスにおいては、脂肪組織だけでなく肝臓でもレプチン遺伝子の発現が認められた（未発表データ）。サケ科魚類は、肝臓には脂肪ではなくグリコーゲンを蓄積するタイプの魚種であるが、フグと同様に肝臓での遺伝子発現が認められた。コイも同様の報告がなされており、魚類では一般的に肝臓でレプチン遺伝子が発現していると考えられる。ニジマスを2週間絶食させ、レプチン遺伝子の発現量の変化を解析したが、絶食に伴う明確な変化は認められなかった。

今のところ、魚類におけるレプチンの生理機能は十分に明らかにされていない。現在我々は、ニジマスの組替えレプチンタンパク質の作製と特異抗体の作製を行い、組替えレプチンのニジマスへの投与実験や、摂餌と血中レプチンレベルの関係を解析する実験を継続している。

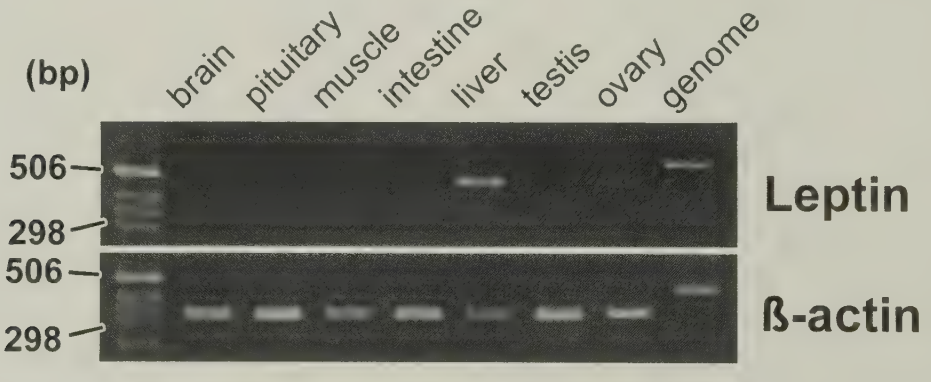


Fig. 3. Expression of *Takifugu* leptin mRNA in adult tissues and genomic DNA. The β -actin fragment of *Takifugu* was also amplified to confirm the steady state level of expression of the housekeeping gene. (Modified from Kurokawa *et al*., 2005).

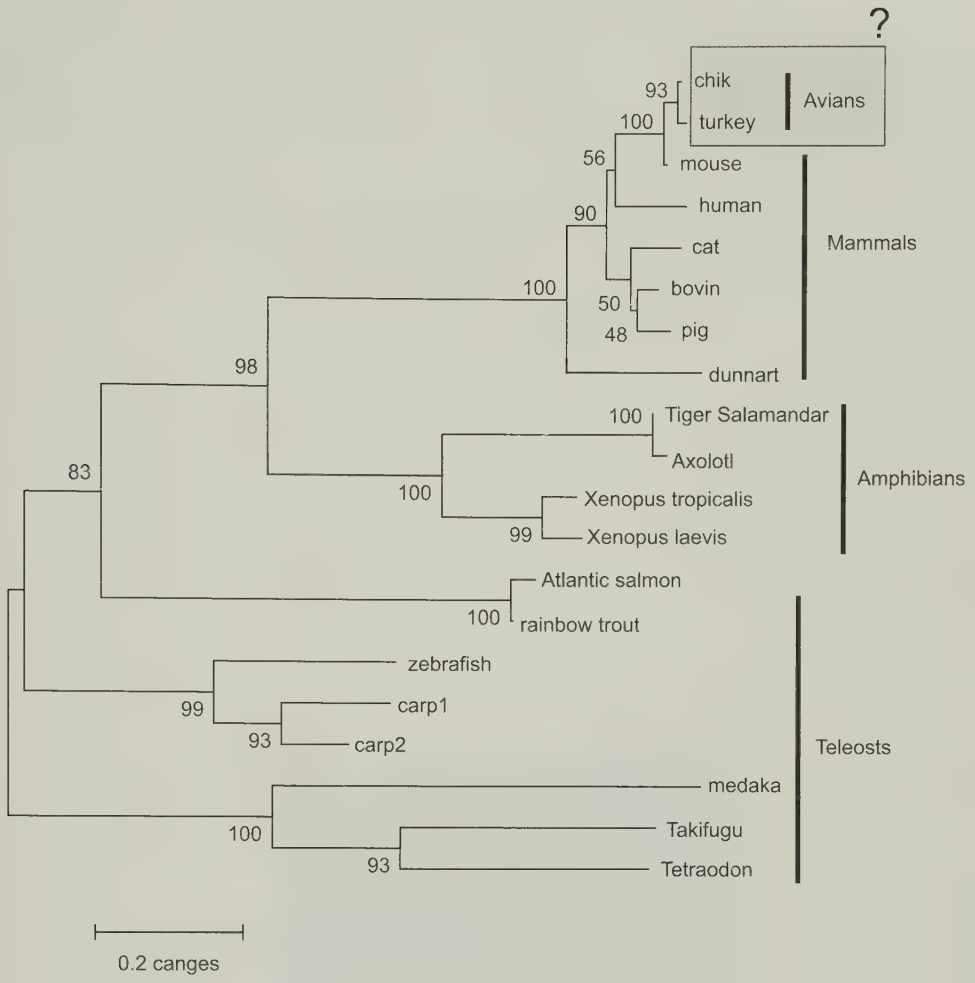


Fig. 4. Phylogenetic relationships among vertebrate leptins were inferred using the neighbor-joining method in Clustal W (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/) and MEGA3(http://www.megasoftware.net/). Scale bar indicates the substitution rate per residue. Numbers at nodes indicate the bootstrap value, as percentages, obtained for 1000 replicates. Avian leptins were shaded due to the uncertainty of the existence of a valid leptin homologue.

Agouti

ほ乳類においては、皮膚で発現している agouti signaling protein (ASIP) と神経系で発現している agouti-related protein (AGRP) という 2 種類の agouti 関連タンパク質があり、melanocortin 受容体 (MC1R – MC5R) を介して melanocortin peptides (melanocyte stimulating hormones/MSHs や ACTH) の内因性アンタゴニストとして機能している (Lu *et al*. 1994; Ollmann *et al*. 1997)。ASIP は、皮膚において MC1R に対する α -MSH のアンタゴニストとして作用し、マウスでは背腹軸方向の体色パターン形成に重要な役割を持つことが知られている (Vrieling *et al*. 1994)。一方、AGRP は脳内の MC3R や MC4R に対する α -MSH のアンタゴニストとして作用し、食欲制御に重要な役割を持っている (Graham *et al*. 1997; Chen *et al*. 2000; Chen *et al*. 2000)。

非ほ乳類の agouti 関連タンパク質としては、ニワトリの AGRP が最初の報告であった (Tachibana *et al*. 2001)。鳥類においても、AGRP はエネルギー代謝に重要な役割を持っていることが示唆されている (Tachibana *et al*. 2001; Boswell and Takeuchi 2005)。魚類の agouti 関連タンパク質については、近年いくつかの報告がなされた。キンギョ (*Carassius auratus*) においては、ASIP が皮膚において α -MSH のアンタ

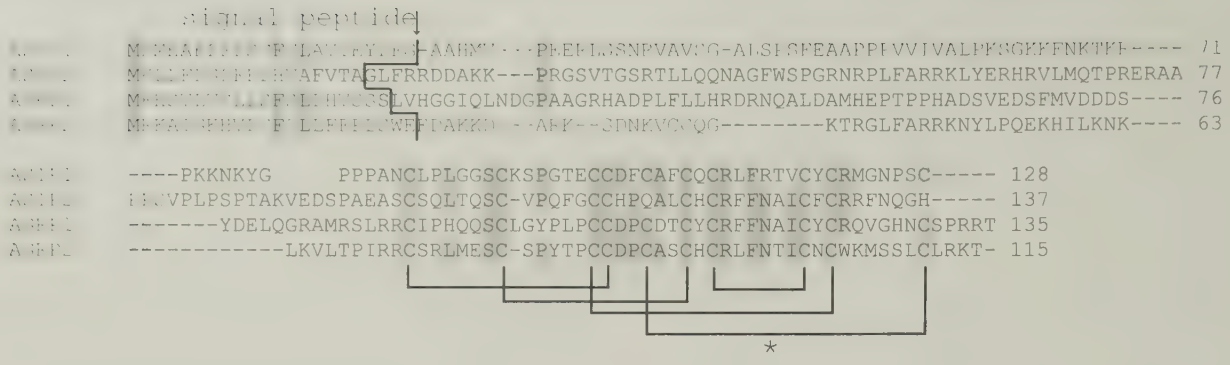


Fig. 5. Alignment of the deduced amino acid sequences of *Takifugu* agouti-family genes with identified cDNA in this study. Deletions are indicated by dashes and shaded areas indicate residues shared among ≥ 70% of sequences. Conserved cysteine residues involved in the formation of disulfide bonds are shown by bridges. Asterisks show that the 5th and 10th cysteine are lacking in pASIP2. The cleavage site was estimated using the SignalP program (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). The amino acid sequences of ASIP1, AGRP1, AGRP2, and ASIP2 (C-terminal) were consistent with Klovins' data (Klovins *et al.*, 2004; 2005). (Modified from Kurokawa *et al.*, 2006).

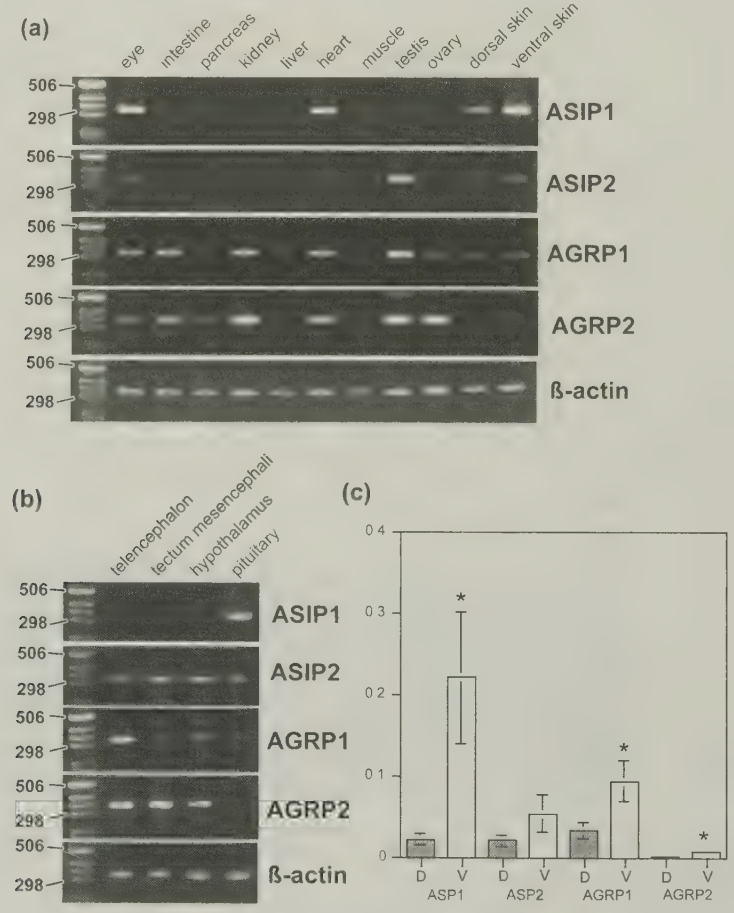


Fig. 6. Expression of Takifugu agouti-family genes in the peripheral organs (a) and in the brain and pituitary (b) analyzed using RT-PCR and in the skin (c) analyzed using real-time PCR. Asterisks show a significantly higher ($P < 0.05$) expression level of agouti-family genes in the ventral skin (V) than in the dorsal skin (D) as indicated by real-time PCR analysis. The β-actin fragment of Takifugu was also amplified to confirm the steady-state level of expression of the housekeeping gene. (Modified from Kurokawa *et al.*, 2006).

ゴニストとしての作用を持つことが報告されている (Cerdá-Reverter *et al*. 2005)。また、脳内の AGRP がエネルギー代謝に関与していることがキンギョやゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) で報告されている (Cerdá-Reverter and Peter 2003; Song *et al*. 2003)。また、トラフグやミドリフグ (*Tetraodon nigroviridis*) においては、哺乳類と異なり 3 種類の agouti 関連タンパク質が報告されていた (Klovins *et al*. 2004; Klovins and Schioth 2005)。

そこで我々は、まずトラフグが何種類の agouti 関連遺伝子を持つのかを明らかにするため、トラフグゲノムデータベースを利用して agouti 関連タンパク質を網羅的に検索した。Agouti タンパク質は、C 末端に agouti-related motifs (5 対の SS 結合を形成するためのシステイン残基が含まれる) と呼ばれる保存性の高い領域がある。このモチーフを基に検索したところ、トラフグには 4 種類の agouti 関連遺伝子を持つことが明らかになった (Kurokawa *et al*. 2006)。C 末端のアミノ酸配列の特徴などから、それぞれトラフグ ASIP1, ASIP2, AGRP1, AGRP2 とした。これら 4 つの agouti 関連タンパク質の C 末端のシステイン残基はよく保存されていたが、ASIP2 だけは 4 番目のシステイン残基対を欠いていた (Fig. 5)。遺伝子構造をゲノムデータベースから推定したところ、ASIP1 と AGRP1 は 4 つのエクソンから、ASIP2 と AGRP2 は 3 つのエクソンから構成されていた。

トラフグにおける agouti 関連遺伝子の組織発現パターンを、RT-PCR および realtime-PCR 法により解析した (Fig. 6)。ASIP1 は、皮膚で最も強く発現しており、背側 (黒色部) に比べて腹側 (白色部) では 5 倍以上強く発現していた。このことから、魚類においても ASIP1 が背腹軸方向の体色パターン形成に関与していると推察された。さらに、ASIP1 は下垂体、眼、心臓で強い発現が認められた。一方、AGRP1 および AGRP2 は、ともに脳だけでなく多くの組織で発現が認められた。このように、melanocortin peptides の内因性アンタゴニストである agouti 関連タンパク質が 4 種類存在し、その組織発現パターンから機能分化をしていると考えられることから、魚類における melanocortin peptides の生理作用は哺乳類のそれよりも複雑であることが予想された。

おわりに

本研究によって、魚類において未同定であったレプチンや agouti 関連タンパク質を同定することができ、食欲制御に関与する因子が魚類においてもようやく解析可能になったと考えられる。

最近、ゼブラフィッシュにおいて、AGRP を過剰発現させると摂餌量の増加が見られるという報告がなされた (Song and Cone 2007)。これは、魚類においても α-MSH と AGRP のシステムが食欲制御に関与していることを示している。魚類においては、4 種類の agouti 関連タンパク質が存在するなどほ乳類との相違点も多いことから、今後レプチンなども含めて総合的に魚類における食欲とエネルギー蓄積の制御機構を解明し、より効率的な飼養技術の開発や遺伝子機能に基づいた育種技術の開発につなげていきたいと考えている。

文　献

Akiyoshi H., and Inoue A., 2004: Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny. *Zoolog. Sci.,* **21**, 841-50.

Amores A., Force A., Yan,Y.-L., Joly L., Amemiya C., Fritz,A., Ho R. K., Langeland J., Prince V., Wan Y.-L., Westerfield M., Ekker M., and Postlethwait, J. H., 1998: Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science*, **282**, 1711-1714.

Boswell T., Dunn I. C., Wilson P. W., Joseph N., Burt D. W., and Sharp P. J., 2006: Identification of a non-mammalian leptin-like gene: characterization and expression in the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*). *Gene. Com. Endocrinol.,* **146**, 157-166.

Boswell T., and Takeuchi,S., 2005: Recent developments in our understanding of the avian melanocortin system: its involvement in the regulation of pigmentation and energy homeostasis. *Peptides*, **26**, 1733-1743.

Broberger C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M. and Hokfelt, T., 1998: The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 15043-15048.

Cerdá-Reverter, J. M., Haitina, T., Schiöth, H. B. and Peter, R. E., 2005: Gene structure of the goldfish agouti-signaling protein: a putative role in the dorsal-ventral pigment pattern of fish. *Endocrinology*, **146**, 1597-1610.

Cerdá-Reverter, J. M. and Peter, R. E., 2003: Endogenous melanocortin antagonist in fish: structure, brain mapping, and regulation by fasting of the goldfish agouti-related protein gene.

Endocrinology, **144**, 4552-4561.

Chen, A. S., Marsh, D. J., Trumbauer, M. E., Frazier, E. G., Guan, X. M., Yu, H., Rosenblum, C. I., Vongs, A., Feng, Y., Cao, L., Metzger, J. M., Strack, A. M., Camacho, R. E., Mellin, T. N., Nunes, C. N., Min, W., Fisher, J., Gopal-Truter, S., MacIntyre, D. E., Chen, H. Y. and Van der Ploeg, L. H., 2000: Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat. Genet.*, **26**, 97-102.

Chen, A. S., Metzger, J. M., Trumbauer, M. E., Guan, X. M., Yu, H., Frazier, E. G., Marsh, D. J., Forrest, M. J., Gopal-Truter, S., Fisher, J., Camacho, R. E., Strack, A. M., Mellin, T. N., MacIntyre, D. E., Chen, H. Y. and Van der Ploeg, L. H., 2000: Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Res.*, **9**, 145-154.

Doyon, C., Drouin, G., Trudeau, V. L. and Moon, T. W., 2001: Molecular evolution of leptin. *Gene. Com. Endocrinol.*, **124**, 188-98.

Elias, C. F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R. S., Couceyro, P. R., Kuhar, M. J., Saper, C. B. and Elmquist, J. K., 1998: Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, **21**, 1375-1385.

Graham, M., Shutter, J. R., Sarmiento, U., Sarosi, I. and Stark, K. L., 1997: Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. *Nat. Genet.*, **17**, 273-274.

Horvath, T. L., Diano, S., Sotonyi, P., Heiman, M. and Tschop, M., 2001: Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance--A hypothalamic perspective. *Endocrinology*, **142**, 4163-4169.

Huising, M. O., Geven, E. J., Kruiswijk, C. P., Nabuurs, S. B., Stolte, E. H., Spanings, F. A., Verburg-van Kemenade, B. M. and Flik, G., 2006: Increased leptin expression in common Carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation. *Endocrinology*, **147**, 5786-5797.

Johnson, R. M., Johnson, T. M. and Londraville, R. L., 2000: Evidence for leptin expression in fishes. *J. Exp. Zool.*, **286**, 718-24.

Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Moriyama, S., Takahashi, A., Kawauchi, H. and Kangawa, K., 2003: Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology*, **144**, 5215-26.

Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L. G., Hirano, T., Grau, E. G. and Kangawa, K., 2003: Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J Endocrinol.*, **176**, 415-23.

Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L. G., Hirano, T., Grau, E. G. and Kangawa, K., 2003: Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, Oreochromis mossambicus. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **135**, 421 9.

Klovins, J., Haitina, T., Fridmanis, D., Kilianova, Z., Kapa, I., Fredriksson, R., Gallo-Payet, N. and Schioth, H. B., 2004: The melanocortin system in Fugu: determination of POMC/AGRP/MCR gene repertoire and synteny, as well as pharmacology and anatomical distribution of the MCRs. *Mol. Biol. Evol.*, **21**, 563-579.

Klovins, J. and Schioth, H. B., 2005: Agouti-related proteins (AGRPs) and agouti-signaling peptide (ASIP) in fish and chicken. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1040**, 363-367.

Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. and Kangawa, K., 1999: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, **402**, 656-660.

Kurokawa, T., Murashita, K. and Uji, S., 2006: Characterization and tissue distribution of multiple agouti-family genes in pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides*, **27**, 3165-3175.

Kurokawa, T., Uji, S. and Suzuki, T., 2005: Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides*, **26**, 745-750.

Lu, D., Willard, D., Patel, I. R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R. P., Wilkison, W. O. and et al., 1994: Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*, **371**, 799-802.

Miller, M. W., Duhl, D. M., Vrieling, H., Cordes, S. P., Ollmann, M. M., Winkes, B. M. and Barsh, G. S., 1993: Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Gene. Dev.*, **7**, 454-467.

Muruzábal, F. J., Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi,

J., Archanco, M. and Burrell, M. A., 2002: Immunocytochemical detection of leptin in non-mammalian vertebrate stomach. *Gene. Com. Endocrinol.*, **128**, 149-52.

Ollmann, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y. K., Kerns, J. A., Chen, Y., Gantz, I. and Barsh, G. S., 1997: Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*, **278**, 135-138.

Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. and Lodish, H. F., 1995: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.*, **270**, 26746-26749.

Song, Y. and Cone, R. D., 2007: Creation of a genetic model of obesity in a teleost. *FASEB J.*, **21**, 2042-2049.

Song, Y., Golling, G., Thacker, T. L. and Cone, R. D., 2003: Agouti-related protein (AGRP) is conserved and regulated by metabolic state in the zebrafish, *Danio rerio. Endocrinology*, **22**, 257-265.

Tachibana, T., Sugahara, K., Ohgushi, A., Ando, R., Kawakami, S., Yoshimatsu, T. and Furuse, M., 2001: Intracerebroventricular injection of agouti-related protein attenuates the anorexigenic effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in neonatal chicks. *Neurosci. Lett.*, **305**, 131-134.

Tamura, H., Kamegai, J., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H. and Oikawa, S., 2002: Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats. *Endocrinology*, **143**, 3268-3275.

Taylor, J. S., Braasch, I., Frickey, T., Meyer, A. and Van de Peer, Y., 2003: Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res.*, **13**, 382-90.

Vegusdal, A., Sundvold, H., Gjoen, T. and Ruyter, B., 2003: An in vitro method for studying the proliferation and differentiation of Atlantic salmon preadipocytes. *Lipids*, **38**, 289-96.

Vrieling, H., Duhl, D. M., Millar, S. E., Miller, K. A. and Barsh, G. S., 1994: Differences in dorsal and ventral pigmentation result from regional expression of the mouse agouti gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 5667-5671.

Wang, L., Saint-Pierre, D. H. and Tache, Y., 2002: Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide.Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci. Lett.*, **325**, 47-51.

Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B. and Bloom, S., 2005: Appetite control. *J. Endocrinol.*, **184**, 291-318.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M., 1994: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372**, 425-32.

水研センター研報，第24号，63－68，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 63－68, 2008

報　文

魚類における体脂肪蓄積機構の解明

奥　宏海*

Molecular and cellular mechanisms of body lipid accumulation in fish

Hiromi OKU

Abstract Lipid is a main component of fish body, which affects flesh quality of cultured fish. In lipid accumulation process in fish body, the activation of various adipogenic genes and the enlargement of lipid storing tissues are postulated to be involved. In this study, we investigated the molecular and cellular aspects of body lipid accumulation process in red sea bream *Pagrus major*. Firstly, to investigate molecular mechanism of lipid accumulation in fish, various adipogenic genes including lipoprotein lipase (LPL1, LPL2), fatty acid synthetase (FAS) and fatty acid desaturase (d6DES, SCDa, SCDb) were characterized in red sea bream. The expression of identified adipogenic genes were, different from those of mammals, detected in various tissues including adipose tissue, hepatopancreas and muscle in red sea bream, suggesting the mechanism of body lipid deposition in fish contains different features from that in mammals. Subsequently, to investigate the cellular aspects of lipid accumulation in fish, the differentiation process of adipocyte, a main site of lipid storage, was analyzed *in vitro* by using primary culture system. In cultured red sea bream adipocytes, the differentiation was enhanced by insulin and the adipogenic gene expression including LPL, FAS, d6DES were activated in differentiation-dependent manner. Furthermore, their expression could be modified by Br-palmitate, a non-metabolic fatty acid. These results provide information on the molecular and cellular mechanisms of lipid accumulation process in fish body.

Key words : lipid metabolism, lipid accumulation, gene, adipocyte, cell culture

飼料より摂取した脂質は生体内でエネルギーとして利用される一方、その余剰分は体脂肪として蓄積される。魚体への脂肪蓄積機構を解明し、適切に体脂肪蓄積をコントロールすることは、品質向上など養殖魚の飼養技術を考える上で重要である。魚体脂肪蓄積にはさまざまな要因が関係すると考えられるが、とりわけ飼料の影響は大きく、これまでにも養殖魚を対象とした体脂肪蓄積に関する研究は飼料の影響を中心に数多く報告されている。我々の研究室においても飼料脂質含量と魚体脂肪蓄積の関係を検討し（Oku and Ogata, 2000）、飼料脂質含量、すなわち摂取脂質量が増加すると、それに応じて体脂肪含量は増加することを明らかにした（Fig.1）。こうした飼育試験や体成分分析による魚体脂肪蓄積に関する研究と比べ、細胞や分子レベルでの脂質蓄積機構に関しては研究が端緒についたばかりでもあり報告は少ない。我々の研究室では、養殖魚における体脂肪蓄積機構を解明する目的で、代表的な養殖魚マダイを中心に分子・細胞レベルでの解析を行った。

代謝酵素から見た脂質の蓄積機構

食餌より摂取した脂質は消化・吸収後、リポタンパク質として血中を輸送され、末梢組織に取り込まれる。リポタンパク質中の脂質は血管上に存在するリポタンパク質リパーゼ（LPL）の働きにより分解され脂肪組織など様々な組織に取り込まれる。

本研究では、まずクローニング解析により、マダイLPL遺伝子の構造的特徴や組織分布を明らかにした（Oku et al. 2002, Oku et al. 2006a）。マダイ脂肪組

2008年4月23日受理（Received on April 23, 2008）
*水産総合研究センター養殖研究所　〒516-0193　三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1（National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, Minami-Ise, Mie, 516-0193, Japan）

織から構造的に類似した2種類のLPL様遺伝子(LPL1, LPL2)が単離され、肝性リパーゼ(HL)や膵リパーゼ(PL)とともに組織分布を調べると、2種のLPLはいずれも魚体内各組織に広範に分布することが明らかとなった(Fig.2)。2種類の遺伝子は発現量が異なり、脂肪組織、肝臓、筋肉の組織においてLPL1の方が約10倍程度高いことのほか、明確な違いが見られず現時点ではその機能的な差異は明らかとなっていない(Oku et al. 2006a)。しかし、いずれの遺伝子も一次構造や組織分布に哺乳類LPLとの間に類似が見られることから、血中リポタンパク質代謝と組織への脂肪取り込みに関与するものと考えられた。

魚体に蓄積される脂肪は食餌に由来するものの他に糖などを基質として新規合成されるものも含まれる。食餌由来の脂質や新規合成された脂質は生体内で不飽和化などの生変換過程を経て蓄積される。脂肪酸生合成、糖利用および脂肪酸不飽和化に関与する遺伝子についてもマダイよりクローニングし、組織分布を決定したところ、高度不飽和脂肪酸生成に関与するd6-不飽和化酵素を除き明瞭な組織特異性は見られず、これらの酵素は魚体内各組織に広く分布するものと考えられる(Fig.2)。

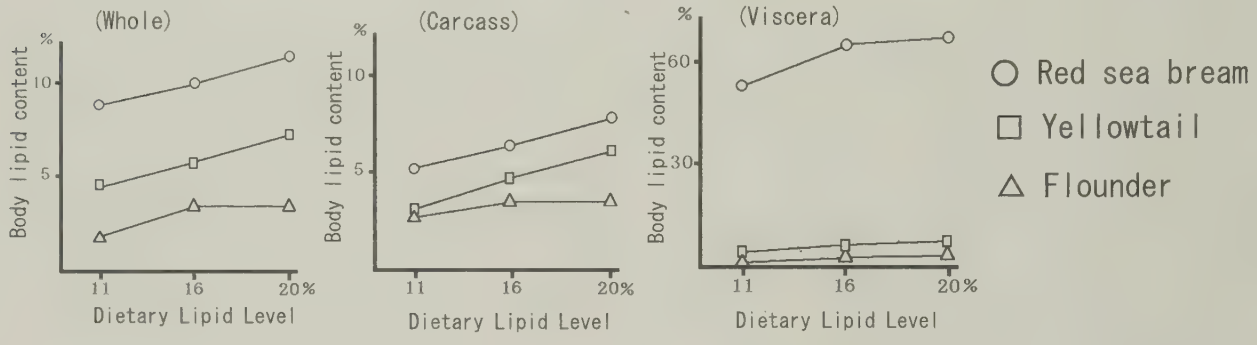


Fig.1. The relationship between dietary lipid levels and body lipid contents. The three diets which has different dietary lipid level (11, 16 and 20%) were fed to the juveniles of red sea bream (○), yellowtail (□) and Japanese flounder (△), and the lipid contents of whole body, carcass and viscera parts were analyzed. The feeding periods are 6weeks (red sea bream and Japanese flounder) or 4 weeks (yellowtail).

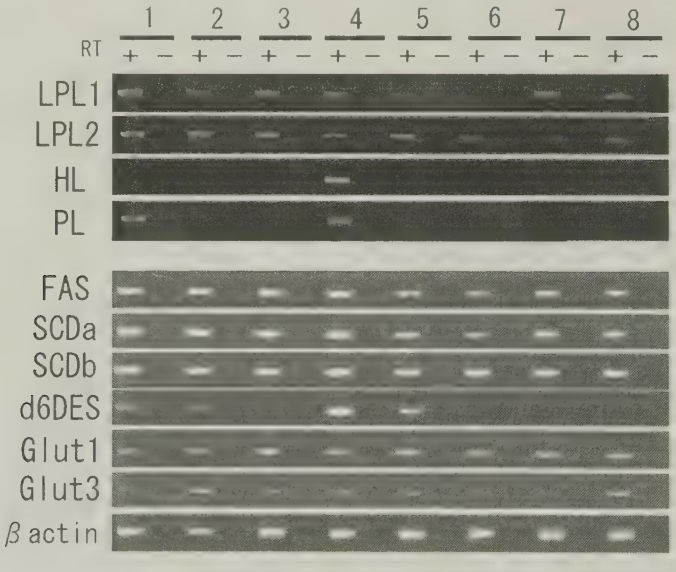


Fig.2. The tissue specificities of the adipogenic gene expression in red sea bream. The tissue specificities were determined by RT-PCR analyses. The gene expression of two lipoprotein lipases (LPL1, LPL2), hepatic lipase (HL) and pancreatic lipase (PL) were detected by 30 cycle amplifications whereas those of fatty acid synthetase (FAS), two stearoyl-CoA desaturases (SCDa and SCDb), delta-6-desaturase (d6DES), two glucose transporters (Glut1, Glut3) and beta actin were detected by 40cycle amplifications. The examined tissues were 1) adipose tissue, 2) gill, 3) heart, 4) hepatopancreas, 5) gonad of young fish, 6) muscle, 7) ovary and 8) testis.

魚類脂肪細胞の初代培養系の確立

魚体への脂肪蓄積を考える上で魚体内の主要な蓄積器官である脂肪組織の発達機構を解明することも重要である。マダイの場合、脂肪組織は腹腔内脂肪組織として存在する他、皮下や筋肉間にも分布する。脂肪組織を構成する脂肪細胞を解析する場合、個体を用いた解析では個体の生理状態や内分泌環境の影響を受けるため、その特性を把握することは困難である。そこで我々はまず、生体から切り離した初代培養系の確立を行った(Oku et al. 2006b)。

Fig.3 にマダイ前駆脂肪細胞の初代培養の概略を示す。マダイ腹腔内脂肪組織から調整した前駆脂肪細胞は比較的容易に培養系に移すことができ、細胞接着後、ウシインスリンおよびハイドロコルチゾン含有無血清培地で培養することにより分化時の特徴である細胞内への脂肪蓄積が確認された。脂肪細胞分化はインスリン濃度依存的に促進され、これらのことから、マダイ初代培養前駆脂肪細胞は培養条件下においても脂肪蓄積能やホルモンへの応答性を保持していることがわかった(Fig.4)。

マダイ脂肪細胞における機能発現とその制御

確立した初代培養系を用い、これまでにマダイより同定した代謝関連遺伝子の発現と脂肪細胞分化の関係について検討した。Table 1 に示したように、マダイ脂肪細胞分化に伴い、様々な遺伝子発現の変動が見られた。分化誘導後の時間経過に応じて LPL や FAS などの脂質代謝に関与する遺伝子の発現は上昇し、脂肪細胞分化に依存して、脂質代謝機能が発現してくるものと考えられる。また、グルコース輸送担体(Glut)や細胞骨格系(β actin)の遺伝子発現にも変動が見られることから、糖代謝や細胞形態に関しても脂肪細胞分化に伴い機能変化が起こることが示唆された。

多くの脂質代謝関連遺伝子はリガンド依存型転写因子 PPAR の制御下にあることが知られており、哺乳類においてはプロスタグランジンなどの脂肪酸代謝物やフィブラート系化合物等が PPAR リガンドとして知られている。マダイ脂肪細胞においても PPAR 作動薬の一つである非代謝性脂肪酸・臭化パルミチン酸を添加することにより機能遺伝子発現への影響が認められた(Fig.5)。脂肪酸合成酵素 (FAS) や脂肪酸不飽和化酵

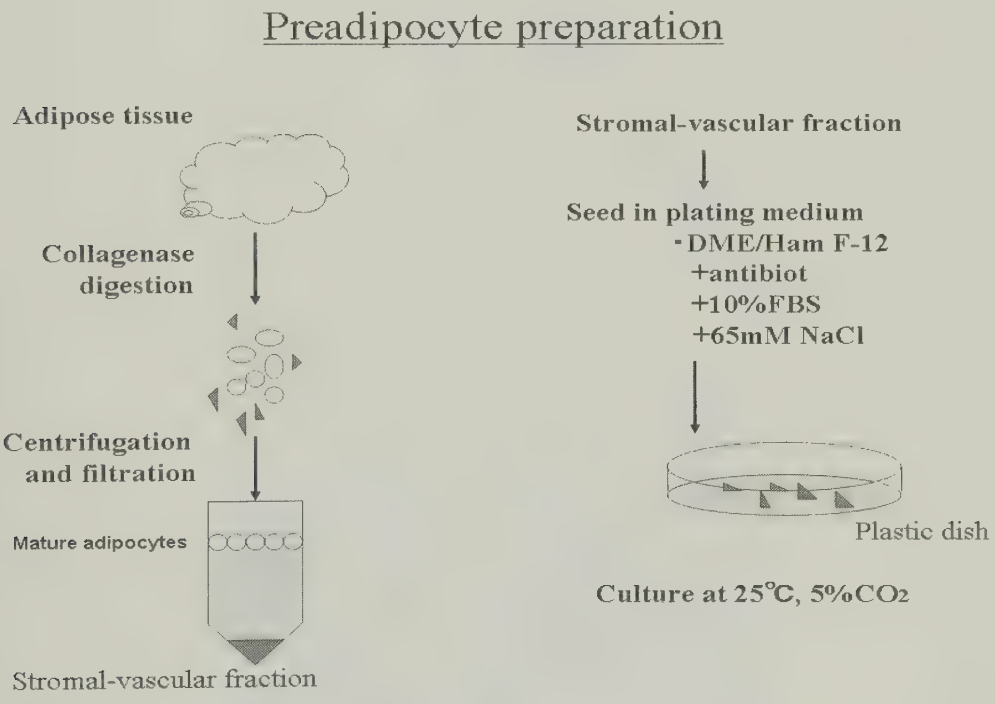


Fig.3. The outline of the preparation procedure for red sea bream preadipocytes. The primary cultured preadipocytes were prepared from visceral adipose tissue of red sea bream. The adipose tissue were minced and digested with collagenase. After purification by filteration and centrifugation, stromal -vascular fraction was seeded in serum-containing culture medium. The attached preadipocytes were cultured at 25° C under the 5%CO2 -95% air condition.

素(d6DES, SCDa, SCDb)などの発現上昇が認められる一方、2種類のLPLに関しては、LPL1は発現上昇するがLPL2は影響されず、それぞれ異なる発現制御を受けていることが示唆された。これらは培養条件下での結果であるが、今後解析が進むとともに、個体レベルにおいても各遺伝子の発現制御の特性を利用した選択的な機能発現の制御が可能になるものと期待される。

おわりに

この研究では養殖魚マダイを用い、魚類における体脂肪蓄積機構を解明することを目的とした。LPLはじめ多くの代謝酵素が同定されたが、その組織分布は哺乳類のものと異なり、魚類における脂質代謝機構が必ずしも哺乳類と一致しないことを示唆する。また、魚類脂肪細胞の初代培養系が確立されたことにより、今後細胞レベルでの魚類脂質代謝機構の解明やその人為的制御への研究の発展が期待される。脂肪組織は脂質の蓄積・代謝を行う場であるとともに内分泌臓器としても個体の恒常性維持に重要な働きをすることが知られる。脂肪組織の発達や機能発現機構を解明し、適切な利用を図ることは今後新しい視点から見た飼養技術の高度化につながるものと考えられる。

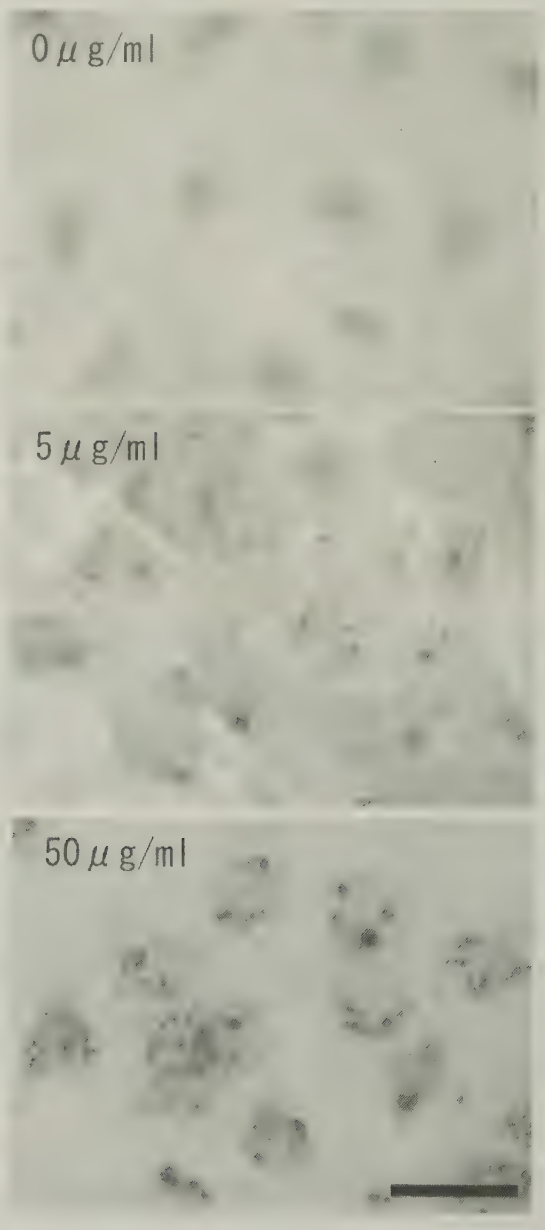


Fig.4. The cellular lipid accumulation by insulin in red sea bream adipocytes. The primary cultured preadipocytes were cultured in a serum-free differentiation medium containing 50ng/ml hydrocortisone and the indicated amounts of bovine insulin for 2 weeks. The cells were stained with sudan black B and nuclear fast red. The bar indicates 50 μ m.

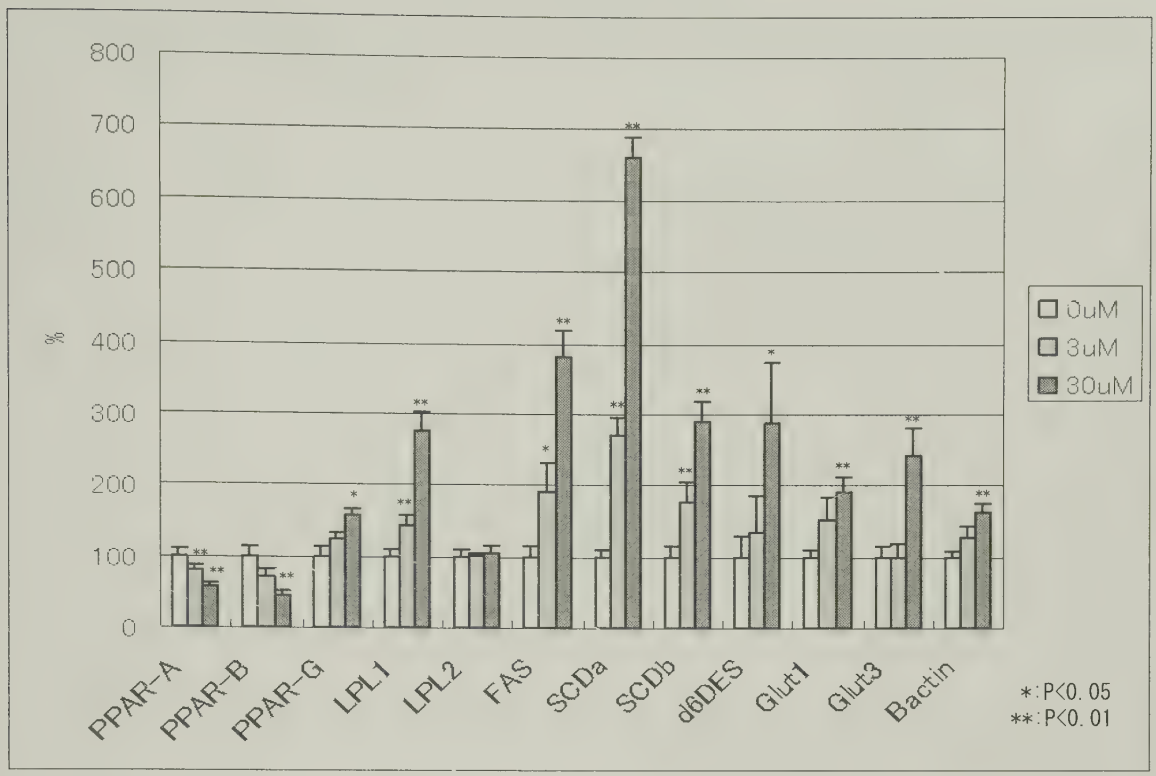


Fig.5. The effects of bromo-palmitate on the adipogenic gene expression in the differentiating adipocytes of red sea bream *in vitro*. The effects of bromo-palmitate on the early process of adipocyte differentiation were investigated. The primary cultured red sea bream preadipocytes were cultured in a differentiation medium for 3days in the presence of the indicated amounts of bromo-palmitate and the relative expression levels of adipogenic genes were analyzed.

Table.1.

The changes in the expression levels of adipogenic genes during adipocyte differentiation of red sea bream *in vitro*

Transcription factor	Fatty acid desaturation
PPAR a↑↓	SCD a↑
PPAR b↑	SCD b↑
PPAR g→	d6DES↑
Cellular lipid uptake	Glucose transport
LPL1↑	Glut1↓
LPL2↑	Glut3→
Lipid synthesis	Cytoskelton
FAS↑	Beta actin↓

The arrows indicates, respectively, transient increase (↑↓), up-regulated (↑), down-regulated (↓) and preserved (→).

文 献

Oku H. and Ogata H. Y., 2000: Body lipid deposition in juvenile of red sea bream Pagrus major, yellowtail Seriola quinqueradiata, and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci*. **66**, 25–31.

Oku H., Ogata H. Y. and Liang X. F., 2002: Organization of the lipoprotein lipase of red sea bream Pagrus major. *Comp. Biochem. Physiol*. **131B**, 775–785.

Oku H., Koizumi N., Okumura T., Kobayashi T. and Umino T., 2006a: Molecular characterization of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase: Effects of fasting and refeeding on their expression in red sea bream *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol*. **145B**, 168–178.

Oku H., Tokuda M., Okumura T., Umino T., 2006b: Effects of insulin, triiodothyronine and fat soluble vitamins on adipocyte differentiation and LPL gene expression in the stromal-vascular cells of red sea bream, Pagrus major. *Comp. Biochem. Physiol.* **144B**, 326–333.

水研センター研報，第24号，69－75，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 69－75, 2008

報　文

魚肉軟化機構の解明と遺伝子導入技術を用いた肉質改善技術の開発

豊原治彦*

Studies on Fish Muscle Tenderization and Improvement of Fish Meat Quality by Transgenic Technology

Haruhiko TOYOHARA *

Abstract Fish meat is rapidly tenderized during storage after death. Muscle tenderization is supposed to be caused by the proteolytic breakdown of collagen in the connective tissue induced by matrix metalloproteinases (MMPs). The activity of MMPs is regulated by the endogenous tissue inhibitors of MMP (TIMPs). After death of fish, the regulation by the TIMPs is lost, thereby revealing the MMPs activity. We made an attempt to produce a transgenic fish line overexpressing TIMP to inhibit post-mortem muscle tenderization by using medaka.

We have successfully established a transgenic medaka line harbored Japanese flounder TIMP (jfTIMP) gene. Transgenic medaka demonstrated the increase in the physical property of the muscle connective tissue after chilled storage. Then, we tried to make a transgenic red seabream having an extra TIMP gene to suppress meat tenderization after death. Since the integration of the introduced TIMP gene in the chromosome was hardly occurred by the similar method of transgenic medaka, co-injection of medaka transposase was applied. As a result, high integration of the foreign gene in the chromosomal DNA was attained in the F_0 generation.

Key words : collagen, muscle, medaka, red seabream, transgenic technology

魚肉は牛肉や豚肉などとくらべて鮮度低下が速やかなため，生肉のまま食用に供することは一般的には困難であり，そのため我が国では魚の保存方法が古来いろいろと工夫されてきた．塩蔵，乾燥などはその代表的なものであるが，そのほかにも燻製，発酵，缶詰などもその一例として挙げることができる．蒲鉾や竹輪などの魚肉練り製品も，一種の保存食品ということができる．

しかし，養殖技術の発達は，我が国における高速道路網の拡充と活魚輸送技術の発達によりもたらされた輸送時間の短縮及び輸送範囲の拡大とあいまって，近年，わが国の魚の消費形態に大きな変革をもたらした．その結果，寿司や刺身のような魚の生食が普及し，現在ではマダイやブリは生産量の大半が養殖魚で占められており，そのほとんどが刺身や寿司ネタとして生（なま）で食べられようになっている．世界的にみると魚の調理法はほとんどが加熱料理であり，日本人が好む寿司や刺身のように魚介類を生食する食文化はまれである．例えば国民一人当たりの魚介類の消費量がずば抜けて多いモルディブでは，ほとんどがカレーの煮込み料理として消費されている．これは魚介類を生で食べるには，一定レベルの鮮度保持技術が必要なため，内陸部や気温が高い熱帯・亜熱帯地域では寿司や刺身などの魚の生食文化が発達しなかったことが原因のひとつと考えられる．しかし最近では養殖技術，輸送技術，鮮度保持技術などの普及に加え，健康志向ブームの追い風もあり，アメリカ，ヨーロッパをはじめ中国，韓国などでも寿司や刺身など魚の生食が受け入れられるようになり，海外で寿司屋を見かけることも珍しいことではなくなってきた．

このように魚介類の養殖は，今後，世界的にますます拡大していくものと予想される．しかし，農業や畜産業が長い時間をかけて優良品種を作出してきたのに対し，魚介類の養殖においてはこれまでほとんど品種

2008年4月23日　受理　(Received on April 23, 2008)
* 京都大学農学研究科応用生物科学専攻　〒606-8502　京都市左京区北白川追分町 (Division of Applied Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawa, Oiwake, Sakyo, Kyoto 606-8502, Japan)

改良がなされてこなかった．この点は同じ一次産業であっても，漁業が農業や畜産業と大きく異なる点である．最近では耐病性の高い系統と成長の早い系統の交配により，すぐれた形質をもった品種の開発が試みられているが，多くの養殖魚は成熟に２３年を要するため，思うように短期間には品種改良が進まないという問題がある．

一方，1970 年代初頭に開発された遺伝子組換え技術は，当初は微生物を対象としたものであったが，その後，植物のほか魚類や哺乳類などの脊椎動物も対象とした技術へと発展してきた．その結果，医学のみならず動植物の品種改良の技術としても注目されるようになってきた．実際 1982 年に，マウスの卵にラットの成長ホルモン遺伝子を注入することにより，通常の約 2 倍の体重を持つジャイアントマウスが作り出され (Palmiter *et al*., 1982)，その後，この方法を用いて様々な動物で同様の実験が試みられ，1994 年にはジャイアントサーモンが作出されるにいたったことはよく知られている (Devlin *et al*., 1994).

魚肉の軟化現象

鮮度のよい魚肉は強い歯ごたえをもつのに対し，鮮度が低下した魚肉は歯ごたえのよさをなくしている．したがって，日本人は生の魚を食べるときには，「鮮度のよい魚ほど歯ごたえがよくておいしい」と判断する傾向がある．ただし，マグロやカツオのように厚い切り身にして食べる魚は，この限りではない．マグロやカツオの場合，活魚が入手できることはきわめてまれであり，これらの魚では，通常，肉質が軟化したものしか流通しておらず，厚い切り身のねっとりとした歯触りを楽しむことになる．そこで以下では，マダイ，ブリ，ヒラメなど，活魚が流通している魚種について話を進めていく．

Fig.1 は魚肉の軟化の様子を示したものである．従来，魚肉の軟化現象は魚体の硬直現象と混同して理解されてきたところがあるが，実際には死後硬直が始まる死後数時間後より早く，即殺直後から魚肉の軟化はおこることがわかる (豊原と志水，1988). 魚種によっては，魚体の最大硬直時に肉質がやや硬くなるものもあるが，多くの養殖魚では Fig.1 に示すように，即殺直後から筋肉の軟化が始まる．この図では，剃刀型のプランジャーを用いたせん断力を測定しているが，円柱形プランジャーによる破断強度測定でも同じ傾向の変化を示す．

魚類の筋肉組織は，大別して筋肉細胞（筋繊維）と結合組織から成っている．前者は主にミオシンとアクチンから，後者はコラーゲンから構成されており，結合組織は筋肉細胞どうしを結着する役割を果たしている .Fig.2 に示すように，魚肉に一定の加重を与えた場合，即殺直後には変化がないが，24 時間冷蔵後には筋肉細胞が部分的に分離している様子が観察された．つまり，新鮮な魚肉が持つ歯切れのよさは筋肉細胞をつないでいる結合組織の強度に依存していると考えられた．結合組織は，畜肉やトラフグのような硬い肉質の魚の筋肉では特によく発達しているが，多くの魚肉の結合組織は未発達である．また，同じ魚種でも天然魚と養殖魚を比較すると，養殖魚の結合組織は未発達である．

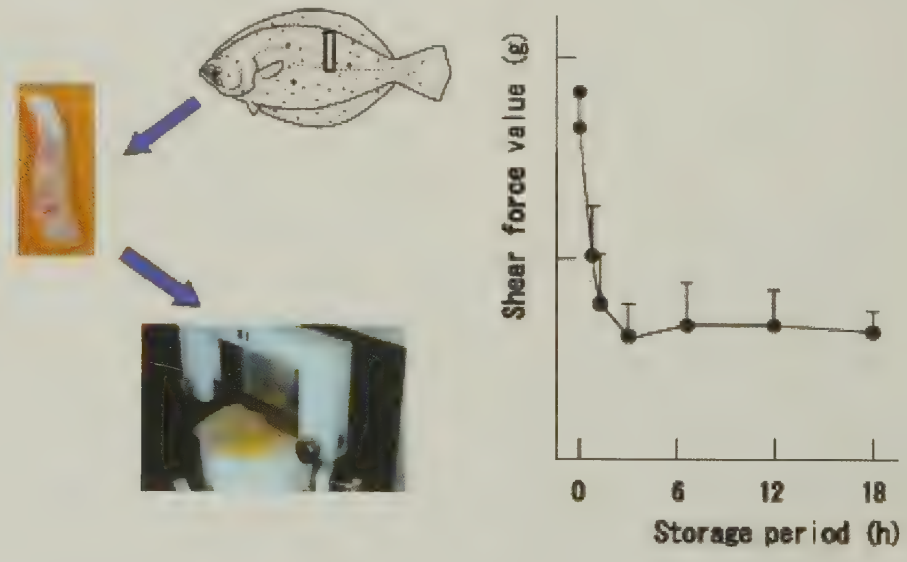


Fig 1. Muscle tenderization after death of fish. Japanese flounder was sacrificed and the piece of muscle was excised. The sheer force value was measured in accordance of the storage period at 4℃ .

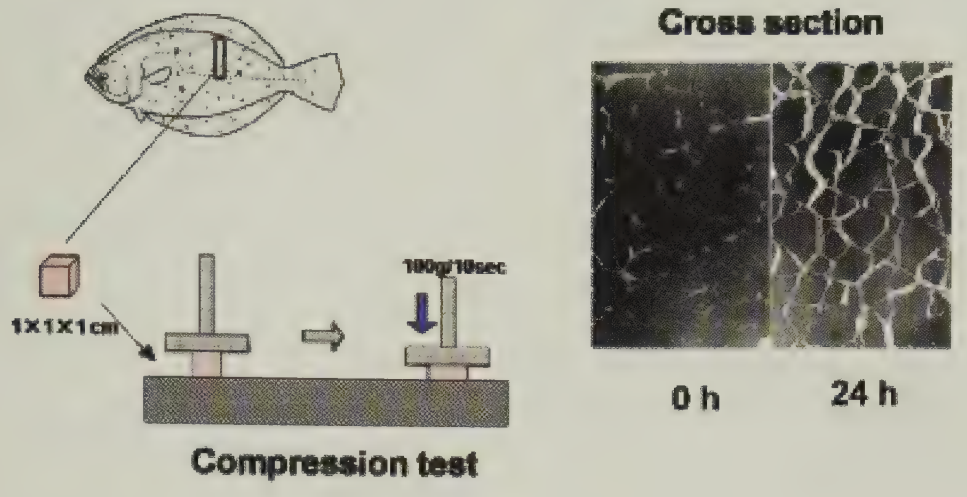


Fig 2. Compression test against the muscle excised immediately after death or 24 h storage. Muscle cross section is shown in the right figures. As shown in the photos, muscle fibers were detached by the compression test (100 g/ 1 sec) after 24 h, suggesting that the physical strength of the muscle connective tissue was lowered during cold storage.

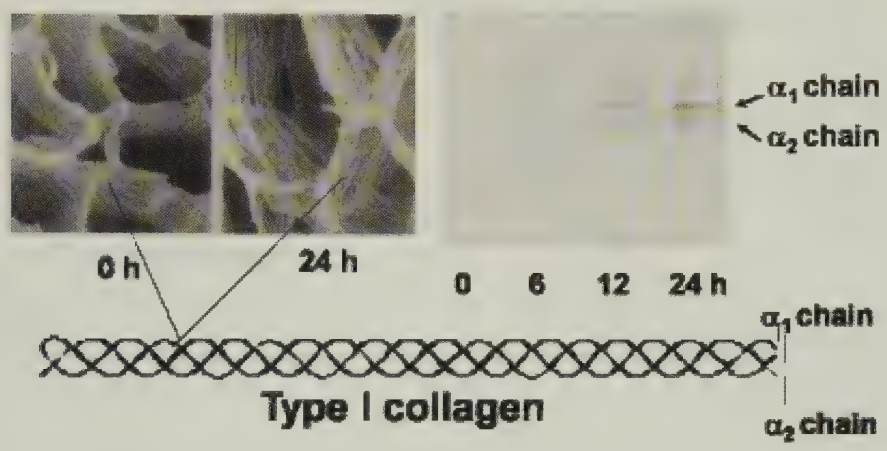


Fig 3. Solubilization of collagen from muscle after death of Japanese flounder. Left two photos are the SEM observation of muscle connective tissue at 0 h and 24 h. Right photo shows the western blot analysis of type I collagen. Gradual Solubilization possibly reflecting the degradation of muscle connective tissue was recognized in the western blot analysis.

Fig.3 は，ヒラメの筋肉をアルカリ処理することで筋肉組織中の筋原繊維タンパク質を分解し，残った結合組織を走査電子顕微鏡により観察したものである．Fig.2 で得られた結果を裏付けるように，24 時間貯蔵したものでは結合組織が脆弱化している様子が観察される．この結合組織の脆弱化がコラーゲンの可溶化によるものであることは，右図に示したウエスタンブロット分析の結果からも支持される．このコラーゲンの可溶化がタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）の作用によるものであることは，Fig.4 に示したプロテアーゼインヒビターの生きたヒラメへの注射実験で確認された．

プロテアーゼは，その活性中心のアミノ酸配列の特徴から，酸性プロテアーゼ（ペプシン，カテプシン D など），システインプロテアーゼ（パパイン，ブロメライン，カテプシン L など），セリンプロテアーゼ（トリプシン，キモトリプシンなど），金属プロテアーゼ（マトリックスメタロプロテアーゼなど）に分類される．それぞれのタイプのプロテアーゼには特有のインヒビターが知られていることから，これらのインヒビターを生きたヒラメの尾部大動脈から注入し，死後の筋肉の軟化に及ぼす影響を調べた（Kubota M. *et al.*, 2003）．その結果，Fig.4 に示すように，金属プロテアーゼのインヒビターである 1，10- フェナントロリンを注入した場合に死後の筋肉の軟化が抑制されることが明らかとなった．この結果から魚肉の軟化には金属プロテアーゼであるマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP と略される）が関わっている可能性が示唆された．

マトリックスメタロプロテアーゼは結合組織を構成する細胞外マトリックスタンパク質を分解する能力を有する酵素の総称であり，基質特異性の異なる30種程度の分子種が存在することが知られている．これらの酵素のうち，MMP-2とMMP-9はコラーゲン分解能を有することから，魚肉の自己消化への関与が疑われた．そこで，ヒラメからこれらの酵素をコードする遺伝子をクローン化し，その組換え体を用いてコラーゲンの分解能を検討した結果，Fig.5に示すように組換えMMP-9を粗結合組織画分に加えると，低温下でもコラーゲンの可溶化が起こることが示された．この結果は，MMP-9が魚肉の軟化現象に関わっていることを示すものであった．

魚が生きている間は，MMP-9の活性は内因性のタンパク性インヒビターであるTIMP(Tissue Inhibitor for Metalloproteinase)により制御されているが，魚が死

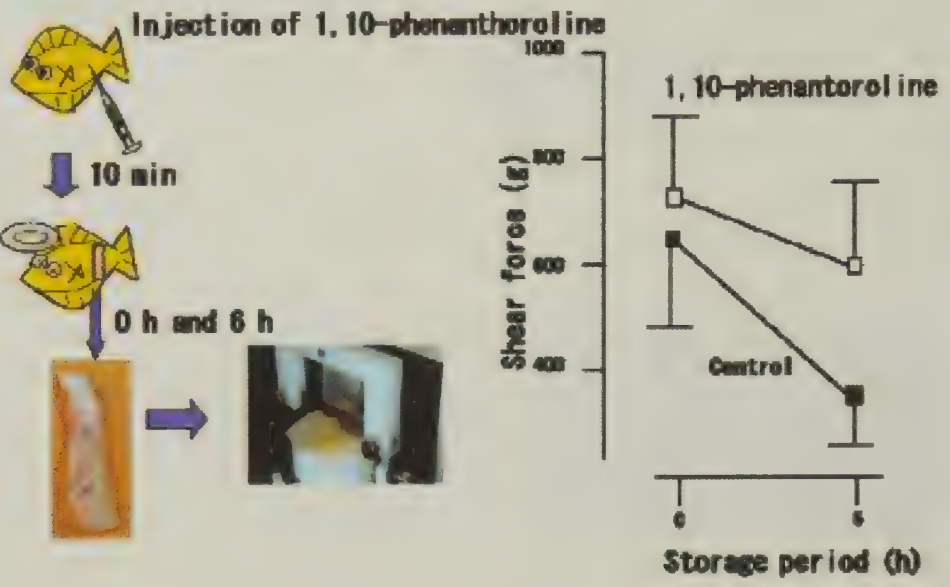


Fig 4. Inhibition of muscle tenderization after death of fish by the injection of 1, 10-phenanthroline, a specific inhibitor of metalloproteinases including MMPs. As shown in the right figure, muscle tenderization was partly inhibited by the injection of 1, 10-phenanthroline, suggesting that MMPs might be implicated in the muscle tenderization after death of fish.

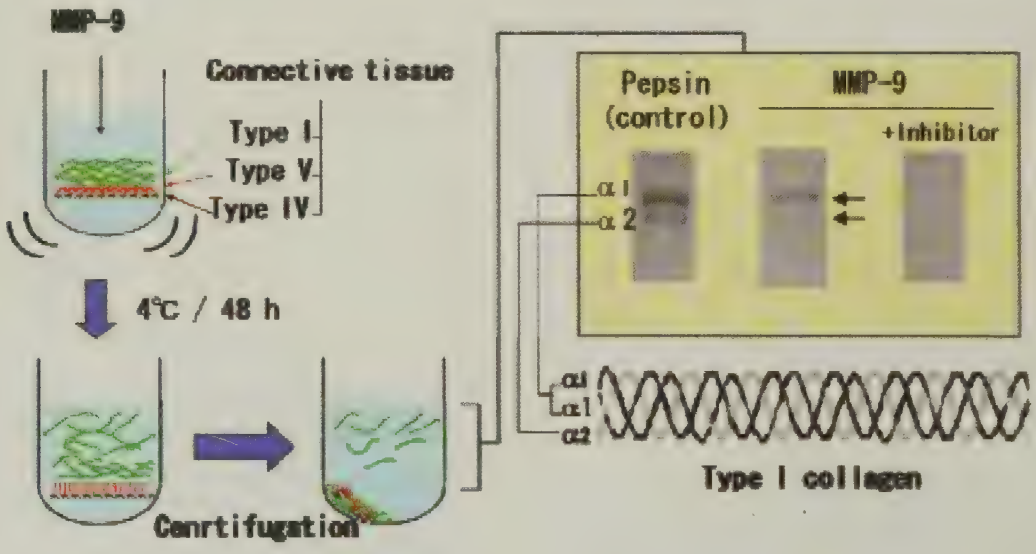


Fig 5. Solubilization of collagen from muscle by recombinant MMP-9. MMP-9 was produced by the insect cell production system. In the presence of MMP-9, collagen was solubilized in vitro similar to in vivo. By adding the specific inhibitor 1, 10-phenanthoroline, the solubilization was completely inhibited, suggesting that MMP-9 has the activity to solubilize collagen from muscle connective tissue. The right panel inserted in the figure shows the western blot analysis of the solubilized fraction.

ぬと何らかの未知のメカニズムによりTIMPによるMMP-9の活性制御が崩壊するものと予想され，その結果，魚肉の軟化が誘発されるものと推測された．

遺伝子組換えメダカの作出

そこで，ヒラメからTIMP遺伝子をクローニングし，その組換え体を用いて*in vitro*におけるMMP-9の活性阻害を調べたところ，用量依存的に阻害を示すことが確認された(Kubota S. *et al.*, 2003)．このようにTIMPが魚肉軟化の原因酵素であるMMP-9の活性を抑制することがわかったので，私たちは，トランスジェニック技術を用いてTIMPを過剰発現させたメダカを作出し，魚肉中のMMPの活性を阻害することで，死後の魚肉の軟化抑制を試みた．

Fig.6にヒラメTIMP遺伝子導入メダカの作出手順を示した．この実験においては，α－アクチンという筋肉だけに発現しているタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域（日下部岳広博士よりご供与）を用いて，メダカの筋肉にヒラメTIMPが発現するように工夫した．

まず，メダカ受精卵にこの発現ベクターを注入し，孵化，成長させF_0を得た．成熟したF_0を野生種と交配しF_1を得，このF_1とさらに野生種と交配しF_2を得た．これらF_2には理論的には50%の個体にヒラメTIMP遺伝子が存在していることになるが，実際，F_2個体の尾ビレの一部を切り取り，ヒラメTIMP遺伝子の存在をPCRで調べたところ，およそ半分の個体にその存在が確認された．そこで，遺伝子導入が確認されたこれらF_2を用いて，ヒラメTIMP遺伝子が実際に転写，翻訳されているのかを検討した．

PCR分析でヒラメTIMP遺伝子の存在が確認されたF_2個体からmRNAを調製し，それを逆転写して得たcDNAについてヒラメTIMP遺伝子の転写産物の有無をPCR分析で調べたところ，トランスジェニック個体においてのみ，ヒラメTIMP遺伝子の転写産物が検出された．さらにその翻訳産物であるタンパク質についてウエスタンブロット分析を行ったところ，mRNAと同様，トランスジェニック個体においてのみその発現が確認された．これらの結果は，人為的に導入したヒラメTIMP遺伝子がF_2世代の個体において，正常に転写，翻訳されていることを証明するものであった(Toyohara *et al.*, 2004).

前述したように，魚の肉質を決定する鍵は結合組織の物理的強度にある．そこで，非導入魚とヒラメTIMP遺伝子導入魚の筋肉組織についてそれぞれ切片を作製し，組織学的観察を行った．非導入魚の筋肉を冷蔵庫で24時間貯蔵後に作製した切片では，ほとんどの筋繊維が筋内膜部分で分離していたが，興味深いことに，ヒラメTIMP遺伝子導入魚の筋肉では，24時間貯蔵後に作製した切片でも筋繊維の分離は認められなかった．この事実は，ヒラメTIMPタンパク質がメダカMMPの活性を阻害し，その結果，トランスジェニック魚で筋内膜の強度低下が軽減された可能性を示していた．

遺伝子組換えマダイの作出

海産魚類養殖は1950年代後半に和歌山県白浜町の近畿大学水産研究所でハマチの網生簀養殖技術が開発されて以降急速に発展し，さらに1980年代後半から養殖用の稚魚（種苗）を卵から人工生産する技術が急

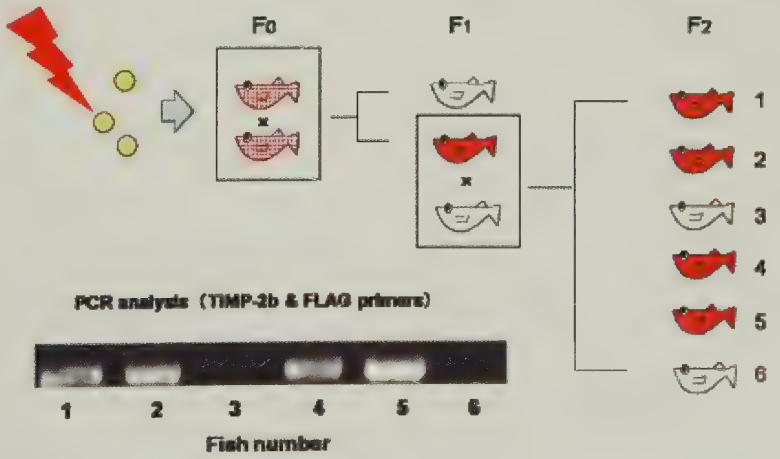


Fig 6. Establishment of the transgenic medaka line having Japanese flounder TIMP-2b gene. Japanese flounder TIMP-2b gene driven by β-actin promoter was microinjected into one cell fertilized egg. As shown in the figure, transgenic medaka having the foreign gene in the chromosomal DNA was made. Integration of the foreign gene was confirmed by the PCR analysis.

速に発展して種苗が安定供給されるようになった結果，海産魚類養殖は現在では我が国の総漁業生産額の約17%を占める重要で欠かせない存在にまで発展している．その中でもマダイは最も重要な養殖魚種の一つであり，2003年の養殖生産量はブリ類に次いで多く約8万3千トンであり，さらに養殖用種苗生産尾数は最も多く同年に5千3百万尾以上が生産されている．

これまでに選択的交配（Murata *et al*., 1996）や染色体操作（Kato *et al*., 2001, 2002, 2003）は試みられてきたが，海産魚の遺伝子組換え技術に関する報告はまだまだ少ない(Zang *et al*., 1998). 魚類でこれまでに行われてきた主要な遺伝子導入方法としてエレクトロポレーション法，パーティクルガンを用いる方法，マイクロインジェクション法などがあるが（Meng *et al*., 1999, Lu et al., 2002, Yazawa *et al*., 2005），マダイにおいては，最も安価で確実な導入方法であるマイクロインジェクション法を採用した．マダイの場合には親魚のサイズが大きく1尾の雌から一度に大量（数万～十数万粒）の未受精卵を得ることができる．またその未受精卵は少なくとも数時間は受精能を保持している．さらに精液は2～3日間は冷蔵保存可能である．これらの特徴とマダイの卵は受精後時間の経過とともに卵膜の硬化が進むこととを考えて，マダイ用にマイクロインジェクション技術を改良した．すなわち，成熟親魚から未受精卵および精液を採取し，数百粒のみ受精して受精後5分以内にマイクロインジェクションを行った．直ちに新たに数百粒のみ受精して受精後5分以内にインジェクションした．

この改良法でマダイβ－アクチンプロモーターを含む発現ベクターをマダイ受精卵に導入したところ，明瞭なGFPの発現が観察されたことから，改良法によって外来遺伝子をマダイの細胞内で発現させることが可能となった．そこで次に肉質改善用の発現ベクターを構築する目的で，マダイゲノムDNAライブラリーから筋肉特異的に発現するα－アクチン遺伝子をクローニングし，筋肉特異的TIMP発現ベクターを構築し，このベクターを用いてトランスジェニックマダイの作出を試みた．しかし，メダカの場合とは異なり，マダイの場合，染色体への外来遺伝子の組み込みはまったくおこらず，TIMPを恒常的に発現する系統の作出はできなかった．

そこで，トランスポゾン様配列で両側をはさんだGFP発現ベクター作製し，メダカのトランスポゼースmRNAとともに共注入を行ったところ，きわめて高率に染色体DNAへの組み込みが起こることがわかった．まだ予備的な実験結果であるが，必ずしもトランスポゼースが共存しなくても高い確率で染色体DNAへの組み込みが検出されたことから，トランスポゾン配列があれば，マダイでも容易に染色体DNAへの組み込みが起こる可能性が示唆された．

おわりに

魚肉の軟化現象は，長く「自己消化」によると説明されてきたが，その詳細な機構は不明のままであった．本研究の結果から，魚肉の軟化現象が筋肉細胞をつないでいる結合組織の物理的強度の低下によること，この強度の低下は結合組織の主要成分であるコラーゲンの可溶化によること，この可溶化は金属プロテアーゼであるマトリックスメタロプロテアーゼの1種であるMMP-9によることなどが明らかとなった．また，MMP-9の活性は内因性のインヒビターであるTIMPにより制御されており，魚の死後，この制御機構が崩壊することによりMMP-9の活性が昂進し，その結果として，結合組織コラーゲンが可溶化することも明らかとなった．

以上の結果を受け，遺伝子組換え技術を用いてヒラメ由来のTIMP-2b遺伝子を過剰発現するトランスジェニックメダカの系統を作出した．この系統のメダカにおいては，死後の筋肉における結合組織の崩壊が抑制されていたことから，遺伝子導入による肉質軟化抑制魚の作出が可能である可能性が示された．同様の方法でトランスジェニックマダイを作出したが，マダイではメダカとくらべて染色体DNAへの外来遺伝子の組み込み率が極端に低かった．そこで，組み込み効率の向上を目的として，トランスポゼースmRNAとの共導入を試みた結果，高い導入を達成することができた．今後は，遺伝子組換え技術を有効に活かしていくために，「食の安心・安全」の観点から，また，「世界的に見た食糧需給」の観点から，国民レベルの議論が必要と考えられる．

文　献

Devlin R.H., Yesaki T.Y.. Biangi C.A., Donaldoson E.M., Swanson P. and Chan W-H. 1994: Extraordinary salmon growth. *Nature*. **371**. 209-210.

Kato K., Hayashi R., Yuasa D., Yamamoto S., Miyashita S., Murata O. and Kumai. H. 2002: Production of cloned red sea bream. Pagrus major by chromosome manipulation. *Aquaculture*. **207**. 19-27.

Kato K., Miyashita S., Murata O. and Kumai H. 2003: Gonadal sex differentiation and sex control in red sea bream. *Pagrus major. Fish Physiol. Biochem*.. **28**.

155-156.

Kato K., Murata O., Yamamoto S., Miyashita S. and Kumai H. 2001: Viability. growth and external morphology of meiotic- and mitotic-gynogenetic diploids red sea bream. *Pagrus major. J. Appl. Ichthyol*. **17**. 97-103.

Kubota M., Kinoshita M., Takeuchi K., Kubota S., Toyohara H. and M. Sakaguchi M. 2003: Solubilization of Type I collagen from fish muscle connective tissue by matrixmetalloproteinase-9 at chilled temperature. *Fish. Sci*.. **69**. 1053-1059.

Kubota S., Kinoshita M., Uji S., Yokoyama Y., Yamamoto E., Hirono I., Aoki T., Sakaguchi M., Morioka K., Itoh Y. and Toyohara H. 2003: Occurrence of two distinct types of tissue inhibitor of metalloproeinase-2 (TIMP--2) in teleost fish. *Biochim. Biophys. Acta*.. **1629**. 102-108.

Lu J.K., Fu B.H., Wu J.L. and Chen T.T. 2002: Production of transgenic silver sea bream (Sparus sarba) by different gene transfer methods. *Mar. Biotechnol*.. **4**. 328-337.

Meng A., Jessen J.R. and Lin S. 1999: Transgenesis. *Methods Cell Biol*.. **60**. 133-148.

Murata. O., Harada. T., Miyashita. S., Izumi. K., Maeda. S., Kato K. and Kumai H. Selective breeding for growth in red sea bream. 1996: *Fish. Sci*.. **62**. 845-849.

Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosenfield M.G., Birnberg. N.C. and Evans R.M., 1982: Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein - growth hormone fusion genes. *Nature*. **300**. 611-615.

豊原治彦．志水寛．1988: 魚体の死後硬直と魚肉の物性の関係．日水誌．**54**. 1795-1798.

Toyohara H., Takagi M., Hosoi M., Kinoshita M., Hirono I., Aoki T. and Kubota S. 2004: Establishment of a transgenic medaka line expressing Japanese flounder tissue inhibitor of metalloproteinase for the suppression of post-mortem meat tenderization. *Mar. Biotechnol*. **6**. S413-417.

Yazawa R., Hirono I., Yamamoto E. and Aoki. T. 2005: Gene transfer for Japanese flounder fertilized eggs by particle gun bombardment. *Fish. Sci*.. **71**. 869-874.

Zhang P., Yongli L., Zongzhu X., Xiang Y., Du S. and Hew C. L. 1998: Gene transfer in red sea bream (*Pagrosomus major*). in "New Developments in marine biotechnology" (ed. By Gal. Y. L. and Halvorson. H. O.). Plenum Press. New York. pp. 15-18.

水研センター研報，第24号，77－82，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 77－82, 2008

報　文

貝類インスリン関連ペプチドの生理機能

淡路　雅彦[*1]・森山　俊介[*2]

Physiological function of the insulin-related peptides in molluscs.

Masahiko AWAJI[*1] and Shunsuke MORIYAMA[*2]

Abstract Peptides structurally related to vertebrate insulin have been identified in invertebrates including mollusks. In the pond snail, *Lymnaea stagnalis*, clusters of neurons called light green cells in the cerebral ganglia produce and release molluscan insulin-related peptides (MIPs) which are suggested to stimulate the use of hemolymph glucose as an energy source by growing tissues. In the sea hare, *Aplysia californica*, *Aplysia* insulin (AI) is produced in the central region of the cerebral ganglia. The expression of AI mRNA decreases when the animal is deprived of food, and injections of AI reduce hemolymph glucose levels. These results suggest that the gastropod insulin-related peptides play important roles in growth control and carbohydrate homeostasis. In bivalves, the structure and gene expression of the insulin-related peptide are detailed only in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. The expression of the oyster insulin-related peptide (oIRP) mRNA increases in March prior to growth and germ cell development, and decreases in July after active spawning. To gain insight into the physiological function of oIRP, changes in the oIRP mRNA levels under food deprivation or glucose administration were examined, but significant changes in the gene expression were not detected.

Key words : insulin, *Lymnaea, Aplysia, Crassostrea*, Mollusca

無脊椎動物を含む様々な動物でインスリンと類似した構造を持つペプチド（インスリンファミリーペプチド）が存在することが知られている。貝類にもインスリンファミリーペプチド（インスリン関連ペプチド）があり、その生理作用の一部として軟体部や殻の成長を維持する機能を持つと考えられている（Smit *et al.*, 1988）。貝類の成長は水温などの物理的環境要因や餌料条件によって変化し、成長が変化する機構を理解することは効率的な養殖を進める上の基礎となる。ここではインスリン関連ペプチドにより貝類の軟体部や殻の成長が維持される機構を中心に、腹足類（巻貝類）、斧足類（二枚貝類）での知見の現状を我々の研究成果も含めて紹介する。

モノアラガイ科 *Lymnaea stagnalis* の MIP

腹足綱有肺亜綱の *L. stagnalis* は中枢神経系を構成する神経細胞が実体顕微鏡下で個別に確認できるほど大きく、神経生物学のモデル動物として利用されている。中枢神経系の神経細胞はいくつかの神経細胞群に類別でき、同じ種類の細胞が集団を作っている。Geraerts(1976) は特定の神経細胞群の除去が貝の生理状態にどのような影響を及ぼすかを検討し、脳神経節の Light Green Cells（LGC、淡緑細胞群）という神経細胞群を除去すると貝の殻と軟体部全体の成長が著しく遅くなり、LGC を含む脳神経節を他個体から移植すると、LGC 除去した個体の成長が正常個体と同じレベルに回復することを明らかにした。この結果から LGC は殻と軟体部の成長を維持する機能を持つホルモンを分泌すると考えられる。

2008年4月23日受理　(Received on April 23, 2008)
[*1] 養殖研究所　〒516-0193　三重県度会郡南伊勢町中津浜浦 422-1 (National Research Institute of Aquaculture, Nakatsuhamaura, Minami Ise, Mie 516-0193, Japan)
[*2] 北里大学水産学部　〒022-0101　岩手県大船渡市三陸町越喜来字烏頭 160 4　(Laboratory of Molecular Endocrinology, School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Sanriku, Iwate 022-0101, Japan)

Geraerts(1992)はLGC除去に伴う体液成分等の変化[illegible]、[illegible]、血リンパ液グルコース濃度が上昇し、軟体部各部のグリコーゲン含量が増加することを示した。一方、殻の形成に関しては、LGC除去により外套膜縁（殻形成部位）のカルシウム結合タンパク質の減少(Dogterom and Doderer, 1981)、殻皮形成の抑制(Dogterom and Jentjens, 1980a)、殻縁へのカルシウムの移行の抑制(Dogterom *et al.*, 1979)が起こることと、LGC産生物がオルニチンデカルボキシラーゼ活性を高めることが示された(Dogterom and Robles, 1980b)。そして単離されたLGCは培養条件下で培地のグルコース濃度が生理的範囲内で上昇するのに応じて脱分極して活性化することが報告されている(Kits et al., 1991)。これらの結果からLGCから分泌されるホルモンは、餌から血リンパ液に吸収されたグルコースを細胞に取り込ませ、エネルギー源として利用することを促進して軟体部や殻の成長を維持すると考えられ、血リンパ液グルコース濃度の上昇によりホルモンの分泌が促進されると予想される。

LGCから分泌されるホルモンの精製は困難な状態が続いたが、Smit et al.(1988)によりLGCではインスリン関連ペプチド（Molluscan Insulin-related peptide, MIP）遺伝子が特異的に発現していることが明らかにされ、遺伝子の情報に基づきペプチド本体も程なく精製され一次構造が確認された(Li *et al.*, 1992)。現在のところ5種類のMIP（MIP Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅶ）がLGCで産生されることが知られており、互いに類似したアミノ酸配列を持っている(Fig. 1)。ゲノムにはこれらに加えてMIP Ⅳ、Ⅵという遺伝子も存在するが、これらは偽遺伝子で機能的なmRNAには転写されない(Smit *et al.*, 1998)。MIPレセプターは1種類が報告されており、中枢神経系と胚での遺伝子発現が確認されている(Roovers *et al.*, 1995)。LGCで特異的に産生されるホルモンがMIPのみであるかは不明であり、精製したMIPをLGC除去した貝に投与する実験もまだ成功していないが、MIPはLGCで産生される成長の維持に必須のホルモンである可能性が高い。ただし、MIP遺伝子はLGCの他に脳神経節近傍のLateral lobe（LL）という部分のCanopy cellでも発現している(Smit *et al.*, 1988)。LLを除去すると成長が大幅に促進されることが知られており(Geraerts, 1976)、Canopy cellのMIPが果たす機能についてはよく理解されていない。またMIP Ⅶは摂餌行動をコントロールする口球神経節でも発現しており、摂餌と何らかのかかわりを持つ可能性も指摘されている(Smit *et al.*, 1996)。

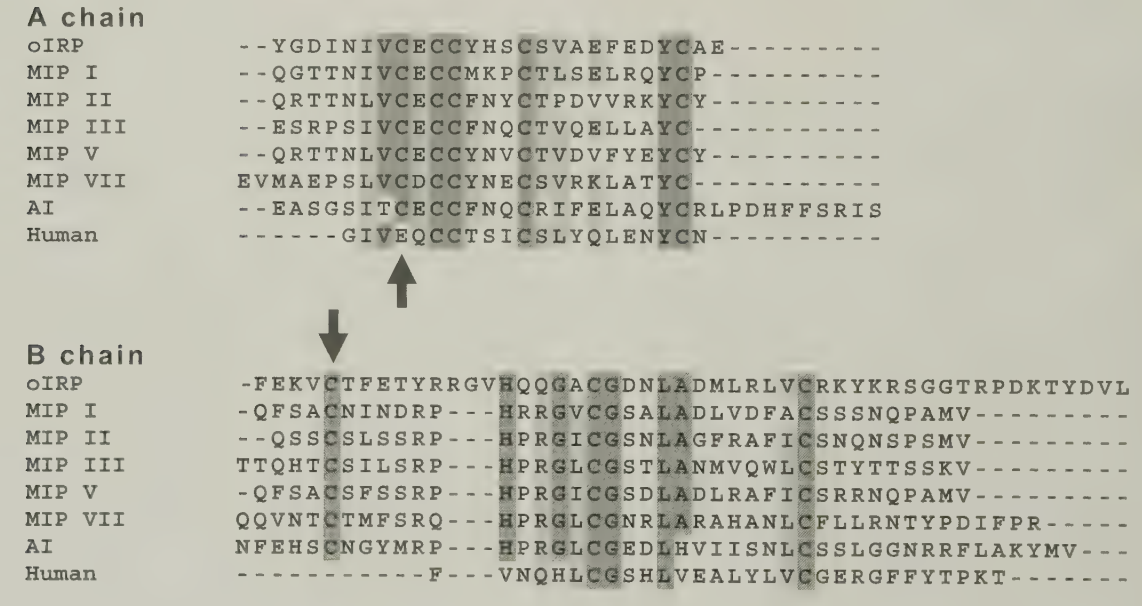


Fig. 1. Amino acid sequence comparison of the insulin-related peptides of mollusks with human insulin. The positions that have an identical residue or similar amino acids are shaded with dark or light grey respectively. Arrows indicate the extra cystein residues of the molluscan insulin. oIRP, Pacific oyster insulin-related peptide; MIP, molluscan insulin-related peptide of *Lymnaea stagnalis*; AI, *Aplysia* insulin; Human, human insulin.

アメフラシ科 *Aplysia californica* の AI

腹足綱後鰓亜綱の *A. californica* ではインスリン関連ペプチド（*Aplysia* insulin, AI）が脳神経節のFクラスター、Cクラスターと呼ばれる神経細胞群で産生され、そのcDNAとペプチドの構造（Fig. 1）が明らかにされている（Floyd *et al.*, 1999）。AIの遺伝子発現は絶食により低下し、精製したAIの投与により血リンパ液グルコース量が低下する（Horn *et al.*, 1998; Floyd *et al.*, 1999）。この結果はMIPと同様にAIが細胞へのグルコースの取り込みとエネルギー源としての利用を促進していることを示唆し、遺伝子発現が餌条件に依存することを示している。一方、*A. californica* のインスリンレセプターは神経系、特に産卵ホルモン（Egg laying hormone、ELH）を産生、分泌する嚢細胞（Bag cell neuron）に多く存在することが報告されている（Jonas *et al.*, 1996）。嚢細胞は培養条件下でヒト・インスリンの作用によりELHを放出することが知られており（Jonas *et al.*, 1997）、AIが産卵にかかわる神経伝達物質としても機能する可能性を示している。最近報告されたA. *californica* 神経系のEST解析においてインスリン関連ペプチドがAI以外に2種類存在することが明らかになり、cDNAが登録されている（Accession number: DQ479392, DQ479393）。摂餌、糖代謝、産卵に異なるインスリン関連ペプチドが関与している可能性がある。

二枚貝のインスリン関連ペプチド

二枚貝に哺乳類のインスリンを投与する実験や二枚貝の組織抽出物中のインスリン様活性を見る実験は1960、70年代から行われ、血リンパ液グルコース量の低下やグリコーゲン合成の促進活性が報告されている（Kasinathan, 1963; Davidson *et al.*, 1971）。抗脊椎動物インスリン抗体を用いた免疫組織化学によるインスリン産生細胞の検討も1970年代から行われ、消化管や神経節に抗体と反応する細胞が検出されている（Fritsch et al., 1976; Kellner-Cousin *et al.*, 1994）。またヒト・組換えIGFがマガキ *Crassostrea gigas* の生殖細胞の増殖や外套膜縁でのタンパク合成を促進すると報告されている（Gricourt *et al.*, 2003; Gricourt *et al.*, 2006）。しかし二枚貝にもインスリン関連ペプチドが存在することはホタテガイ *Patinopecten yessoensis* のインスリン関連ペプチドcDNAがNaraokaによりGenBankに登録され（Accession number: AB125891）、マガキにおけるHamano *et al.*(2005)の詳細な検討が報告されて初めて明らかになった。Hamano *et al.*(2005)はマガキインスリン関連ペプチド（oIRP）のcDNAをクローニングし、推定アミノ酸配列のA,B両鎖にシステイン残基が脊椎動物より一つずつ多くあり、腹足類と同様の特徴を持つことを示した（Fig. 1, 矢印）。oIRPのmRNAは3種類存在し、内臓神経節で発現している。そして遺伝子発現の季節変化を検討した結果、生殖巣の発達や軟体部、殻の成長が進む春に遺伝子発現が高まることを明らかにした。生殖巣の発達や軟体部、殻の成長には複数のホルモンが関与すると予想されるが、その中でoIRPが一定の機能を果たしている可能性がある。

腹足類での研究成果から、インスリン関連ペプチドは二枚貝においても細胞内へのグルコースの取り込みとエネルギー源としての利用を促進し，その遺伝子発現とホルモンの分泌が餌条件や血リンパ液グルコース量により変化する可能性が考えられる。そこで餌条件や血リンパ液グルコース量に応じた遺伝子発現変化がマガキでも観察されるかを検討した。給餌飼育したマガキを2群に分けて1群は給餌を続け、他の1群は絶食させて、内臓神経節でのoIRP遺伝子発現と血リンパ液グルコース量、軟体部グリコーゲン量の変化を比較した。その結果、絶食区は血リンパ液グルコース量が実験開始時よりも減少するが、oIRP遺伝子発現量には有意な差があるとは言えなかった（Fig. 2）。また20mMグルコース含有海水にマガキを浸漬すると血リンパ液グルコース量が対照区の10倍ほどに有意に上昇するが、oIRP遺伝子発現には対照区と有意な差があるとは言えない事も示された（Fig. 3）。これらの結果はマガキoIPRの遺伝子発現が餌料条件や血リンパ液グルコース量で単純に調節されるものではないことを示唆している。

おわりに

二枚貝におけるインスリン関連ペプチドの生理機能は未だ解明できていないが、マガキoIRP遺伝子発現の季節変化のパターンから、腹足類と同様に細胞内へのグルコースの取り込みとエネルギー源としての利用を促進している可能性が考えられる。今後マガキoIRPなど二枚貝インスリン関連ペプチドの精製、そして組換えペプチドの産生を進め、培養条件下での生理機能の検討や体内でのペプチド分泌の動態を解明することが生理機能解明に不可欠である。またインスリン関連ペプチドが細胞内へのグルコースの取り込みとエネルギー源としての利用を促進する機能を有するならば、組換えペプチドを貝類の細胞培養に利用することで、現在のところ困難である培養細胞系の樹立などに結びつく可能性がある。

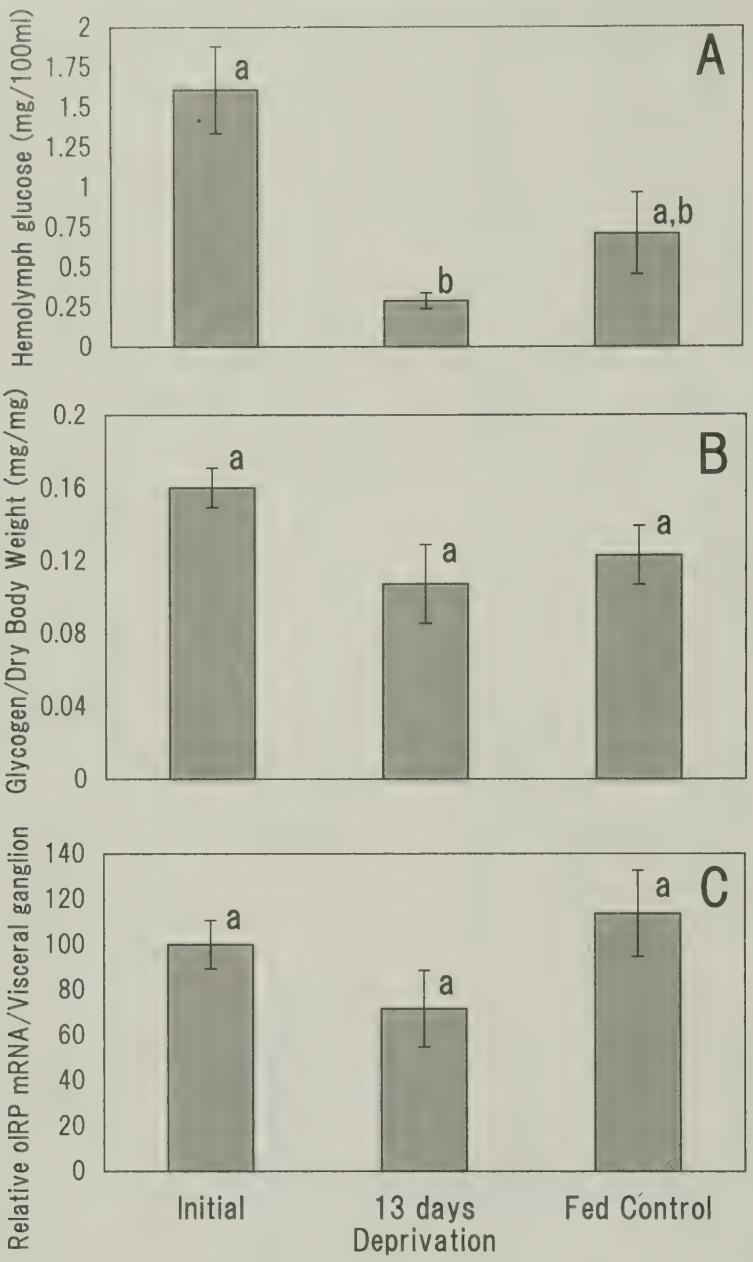


Fig. 2. Effects of food deprivation on the hemolymph glucose concentration (A), glycogen content of the dry meat (B), and the oIRP mRNA level in the visceral ganglion (C) of the Pacific oyster. Each column with a vertical bar represents the mean ± SEM. Groups sharing a common letter do not differ significantly ($p>0.05$).

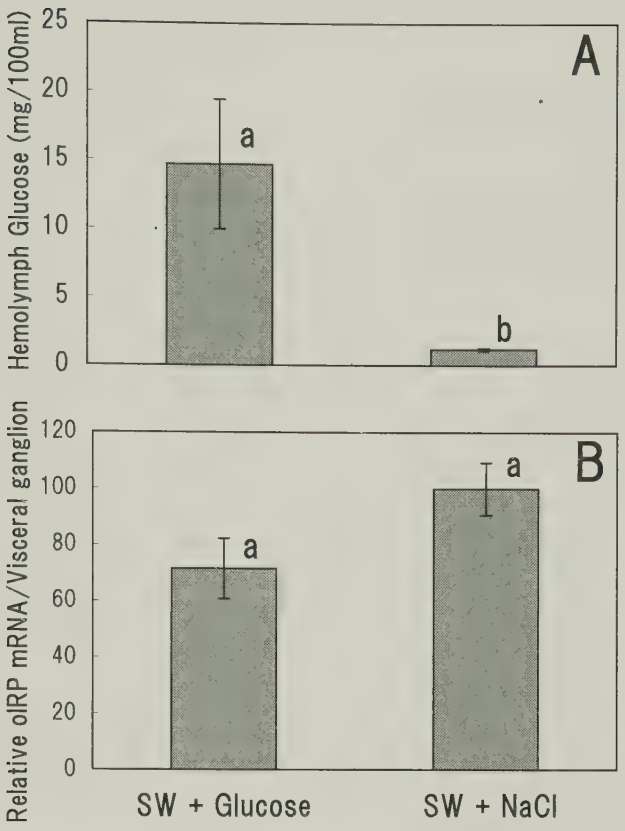


Fig. 3. Effects of glucose administration on the hemolymph glucose concentration (A) and the oIRP mRNA level in the visceral ganglion (B) of the Pacific oyster. Oysters were immersed in the seawater containing 20 mM glucose or 10 mM NaCl for 90 min at 14 ℃. Each column with a vertical bar represents the mean ± SEM. Groups sharing a common letter do not differ significantly ($p>0.05$).

文　献

Davidson J.K., Falkmer S., Mehrotra B.K., and Wilson S., 1971: Insulin assays and light microscopical studies of digestive organs in Protostomian and Deuterostomian species and in Coelenterates. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **17**, 388–401.

Dogterom A.A., Loenhout H. van, Schors R. C. van der., 1979: The effect of the growth hormone of *Lymnaea stagnalis* on shell calcification. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **39**, 63 68.

Dogterom A.A. and Jentjens T., 1980a: The effect of the growth hormone of the pond snail *Lymnaea stagnalis* on periostracum formation. *Comp. Biochem. Physiol.*, **66A**, 687–690.

Dogterom A.A. and Robles B.R., 1980b: Stimulation of ornithine decarboxylase activity in *Lymnaea stagnalis* after a single injection with molluscan growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **40**, 238–240.

Dogterom A.A. and Doderer A., 1981: A hormone dependent calcium-binding protein in the mantle edge of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis. Calcif. Tissue Int.*, **33**, 505–508.

Floyd P.D., Lingjun L., Rubakhin S.S., Sweedler J.V., Horn C.C., Kupfermann I., Alexeeva V.Y., Ellis T.A., Dembrow N.C., Weiss K.R., and Vilim F.S., 1999: Insulin prohormone processing, distribution, and relation to metabolism in *Aplysia californica. J. Neuroscience*, **19**, 7732–7741.

Fritsch H.A.R., Noorden S. van, and Pearse A.G.E., 1976: Cytochemical and immunofluorescence investigations on insulin-like producing cells in the intestine of *Mytilus edulis L.* (Bivalvia). *Cell Tissue Res.*, **165**, 365 369.

Geraerts W.P.M., 1976: Control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis. Gen. Comp. Endocrinol.*, **29**, 61–71.

Geraerts W.P.M., 1992: Neurohormoal control of growth and carbohydrate metabolism by the light green cells

in *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **86**, 133-141.

Gricourt L., Bonnec G., Boujard D., Mathieu M., and Kellner K., 2003: Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrIGF-1 effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **134**, 44-56.

Gricourt L., Mathieu M., and Kellner K., 2006: An insulin-like system involved in the control of Pacific oyster *Crassostrea gigas* reproduction: hrIGF-1 effect on germinal cell proliferation and maturation associated with expression of homologous insulin receptor-related receptor. *Aquaculture*, **251**, 85-98.

Hamano K., Awaji M,, and Usuki, H., 2005: cDNA structure of an insulin-related peptide in the Pacific oyster and seasonal changes in the gene expression. *J. Endocrinol.*, **187**, 55-67.

Horn C.C., Koester J., and Kupfermann I., 1998: Evidence that hemolymph glucose in *Aplysia californica* is regulated but does not affect feeding behavior. *Behavioral Neuroscience*, **112**, 1258-1265.

Jonas E.A., Knox R.J., Kaczmarek L.K., Schwartz J.H., and Solomon D.H., 1996: Insulin receptor in *Aplysia neurons*: Characterization, molecular cloning, and modulation of ion currents. *J. Neuroscience,* **16**, 1645-1658.

Jonas E.A., Knox R.J., Smith T.C.M., Wayne N.L., Connor J.A., and Kaczmarek L.K., 1997: Regulation by insulin of a unique neuronal Ca^{2+} pool and of neuropeptides secretion. *Nature*, **385**, 343-346.

Kasinathan S., 1963: Effect of insulin on carbohydrate metabolism of the bivalve mollusk *Meretrix casta* (Chemnitz). *Proc. Indian Acad. Sci.*, **B58**, 367-374.

Kellner-Cousin K., Mialhe E., and Mathieu M., 1994: Identification of insulin-like peptides in cerebral ganglia neurosecretory cells of the mussel *Mytilus edulis*. *Tissue and Cell*, **26**, 891-899.

Kits K.S., Bobeldijk R.C., Crest M., and Lodder, J.C., 1991: Glucose-induced excitation in molluscan central neurons producing insulin-related peptides. *Pflugers Arch.*, **417**, 597-604.

Li K.W., Geraerts W.P.M., and Joosse J., 1992: Purification and sequencing of molluscan insulin-related peptide II from the neuroendocrine light green cells in *Lymnaea stagnalis*. *Endocrinology,* **130**, 3427-3432.

Roovers E., Vincent M.E., Kesteren E. van, Geraerts W.P.M., Planta R.J., Vreugdenhil E., and Heerikhuizen H. van, 1995: Characterization of a putative molluscan insulin-related peptide receptor. *Gene*, **162**, 181-188.

Smit A.B., Vreugdenhil E., Ebberink R.H.M., Geraerts W.P.M., Klootwijk J., and Joosse J., 1988: Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature*, **331**, 535-538.

Smit A.B., Spijker S., Minnen J. van, Burke J.F., Winter F. de, Elk R. van, and Geraerts W.P.M., 1996: Expression and characterization of molluscan insulin-related peptide VII from the mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience*, **70**, 589-596.

Smit A.B., Kesteren R.E. van, Li K.W., Minnen J. van, Spijker S., Heerikhuizen H. van, and Geraerts W.P.M., 1998: Towards understanding the role of insulin in the brain: Lessons from insulin-related signaling systems in the invertebrate brain. *Progress in Neurobiology*, **54**, 35-54.

水研センター研報，第24号，83－89，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 83－89，2008

報　文

ゲノムデータベースを利用したトラフグ優良形質遺伝子の探索

渡部終五[*1]・木下滋晴[*1]・池田大介[*1]・古川聡史[*1]・鈴木　譲[*2]・菊池　潔[*2]・甲斐　渉[*2]

Screening of superior trait-related genes of torafugu by using the genome database

Shugo WATABE[*1], Shigeharu KINOSHITA[*1], Daisuke Ikeda[*1], Satoshi Furukawa[*1], Yuzuru SUZUKI[*2], Kiyoshi KIKUCHI[*2], and Wataru KAI[*2]

Abstract Torafugu *Takifugu rubripes* is an attractive vertebrate model organism for genomics by virtue of its smallest genome among vertebrates and available whole-genome database. Our group has constructed the torafugu linkage map with over 400 markers. In this study, we screened superior trait-related genes of torafugu by using the genome database and linkage map. Following two groups of genes were screened and analyzed, 1: Growth and muscle formation related genes, 2: Sex determining genes. (1) Quantitative trait loci (QTL) associated with high growth were screened by linkage analysis in crosses between a high-growth selected male and wild female. By using microsatellite markers, we identified several loci which may relate to the high-growth trait. We also analyzed genes (*MYHs*) encoding myosin heavy chain, the most important functional molecule among muscle proteins. A comprehensive analysis on the genome database revealed at least 28 *MYHs* in torafugu, almost twice as many as in humans. Expression analysis of each *MYH* showed their developmental stage-specific and tissue-specific expressions. (2) By performing linkage analyses, we showed that the sex of torafugu is determined by a single chromosomal region named SDY on linkage group 19 in an XX-XY system.

Key words : genome database, myosin heavy chain, QTL, sex determination, torafugu

トラフグ Takifugu rubripes については近年、全ゲノム解析が行われ、この遺伝子情報を基にしたバイオテクノロジーおよびハイテクノロジーの進展が期待されている。検索が容易な遺伝子情報を利用してトラフグの優良遺伝形質を特定し、これを効率の良い養殖技術の展開に活用することが期待される。そこで我々はトラフグを主対象に、1）筋発生および成長、2）性統御、の２つの小課題を設定し、研究を遂行した。1）については高成長系トラフグの形質に関連する遺伝子の同定や可食部である筋肉の成長機構の解明を行うことで高成長のマーカー遺伝子が確立し、耐病性などほかの優良遺伝形質を兼ね備えた超優良品種の選抜育種の実現が可能となる。一方、2）については市場価値の高い白子をもつ雄の選択的生産や、新しい有用な品種を作成した場合に、その無制限な拡散を防止するための技術の確立に役立つ。我々はトラフグゲノムデータベースを活用して上述した２課題に取り組み、その機構解明と関連遺伝子の同定を目指した。

トラフグゲノムの特徴

ヒトのゲノムサイズは3000Mb であるが、含まれる構造遺伝子の数は20000～27000とされ、そのゲノム全体に占める割合は僅か1.5%程度にすぎない。その他、遺伝子の発現調節に使用される転写調節領域や、最近その機能が注目されている small RNA などが

2008年4月23日受理　(Received on April 23, 2008)
[*1] 東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物工学研究室　〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1（Laboratory of Aquatic Molecular Biology and Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan）
[*2] 東京大学大学院農学生命科学研究科農学部付属水産実験所　〒431-0214 静岡県浜松市舞阪町弁天島2971（Fisheries Laboratory, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Maisaka, Shizuoka 431-0214, Japan）

転写される領域があるが、ゲノムの大部分は機能を持たないDNAと考えられている。一方、トラフグのゲノムサイズは365Mbであり、これはヒトの約1/8で、脊椎動物中最も小さい。ところが、遺伝子数は21000程度とヒトとほぼ同数である（Brenner et al., 1993, Aparicio et al., 2002）。すなわち、トラフグゲノムには機能をもったDNA配列が集約されており、無駄な情報が少ないと考えられる。実際に、トラフグゲノムの配列をみると、繰り返し配列の量はヒトではゲノム全体の50%にもなるが、トラフグではわずか15%以下である（Ikeda and Watabe, 2004）。また、イントロンの75%はヒトでは2609bp以下であるのに対し、トラフグでは425bp以下である。

現在様々な生物種で全ゲノム解析の成果が報告され、膨大なゲノム情報が蓄積されている。その中から、意味のある（機能のある）領域を抽出することは困難であり、ポストゲノム研究の課題の一つとなっている。このような状況下で、トラフグはゲノム解析のモデルとして大きく注目されている。

トラフグ連鎖地図の作成

我々は、ゲノムデータベースを利用して、標識となるDNA配列（マーカー）の抽出とそれを利用した連鎖解析を行い、トラフグの連鎖地図を作成した（Furukawa et al., 2004, Kai et al., 2005）。これまでに、マイクロサテライトを中心とする400以上の多型マーカーを用いてトラフグの染色体数に一致する22連鎖群からなる連鎖地図を作成し、全ゲノムの約60%の配列の予想遺伝子をマッピングしており、様々な形質を支配する遺伝子座を特定できる体勢になっている。現在トラフグ連鎖地図はウェブ上で公開されている（http://www.se.a.u-tokyo.ac.jp/Fugu-Map/map.html.）。

優良な形質を示すトラフグ系統のQTL解析

体重や体長といった連続的な値によって表される表現型を量的形質（quantitative trait, QT）と呼ぶ。量的形質の決定は複数の遺伝子座の働きの組み合わせによると考えられ、この量的形質の発現に関連する遺伝子座（quantitative trait loci, QTL）を同定するのがQTL解析である。具体的には遺伝子型が異なる個体からなる集団について調査を行い、マーカーの遺伝子型と形質の表現型の関連を統計学的に解析する。

我々はトラフグの高成長と目される雄と天然魚雌の組み合わせ2組を2006年2月に長崎種苗株式会社にて人工交配させ、得られた2系統（LおよびR系統）をQTL解析に用いた。F1集団2系統、計184個体の孵化1ヶ月後の全長を測定し、これを表現型値とした。マイクロサテライトマーカー計135個を用いて、同集団の遺伝子型決定を行った。表現型とマーカー分離型との対応関係をソフトウェアMAPLで調べ、QTL解析を行った。QTL解析に用いたL系統の体長の平均値および分散値はそれぞれ8.03および1.32 mmで、R系統のそれは6.73および0.633 mmであった。両系統とも表現型値はほぼ正規分布に従った。遺伝子型解析では、用いたマーカーのうちほとんどが連鎖解析上有用な多型を示した。QTL解析により、複数の遺伝子座が高成長に関与していることが示唆されたが、LOD値は統計学的に有意なピークを示さず、遺伝子座の同定には至っていない。

ミオシン重鎖遺伝子のスクリーニングと筋形成における発現制御機構

トラフグの可食部である筋肉はいかに形成されるのか、そのメカニズムの解明は、肉質の改善や効果的な育種など、産業への応用に直結する。また、上述の高成長の形質を示すトラフグについて、筋形成の制御機構を調べることで、高成長のメカニズムの解明にもつながることが期待される。筋肉には様々な筋特異的タンパク質が含まれるが、我々はII型ミオシンの重鎖サブユニット（myosin heavy chain, MYH）に着目した。MYHはATPやアクチンとの結合部位を持ち、ATPの化学エネルギーをミオシン－アクチン相互作用による運動エネルギーに変換する筋収縮運動の主体となる分子である。MYHには一次構造の異なる複数のアイソフォームが存在し、それぞれが特異的な発現パターンを示すことで、速筋や遅筋、心筋といった筋肉の性質を規定する。さらに、運動や成長などでMYHアイソフォームの組成は変化し、筋肉を適応的に変化させる。

我々は、既報のコイ*MYH*の配列を用いてトラフグゲノムデータベースをスクリーニングすることでトラフグ*MYH*を網羅的に解析した。その結果、トラフグゲノムには少なくとも28個の*MYH*があり、これはヒトの2倍に相当すること、速筋型*MYH*はゲノム上の5ヶ所に分散し、そのうち3ヶ所ではクラスターを形成していることを明らかにした（Figure 1）（Ikeda et al., 2004, 2007, Watabe & Ikeda, 2006）。ヒトゲノムとのシンテニー解析では、ヒトの速筋型*MYH*のクラスターに対応するトラフグの領域は倍数化しており、それぞれ1個の*MYH*を含むことが示された。トラフグ*MYH*については、翻訳産物の一次構造から速筋、遅筋、心筋などの組織特異的タイプに分類し、その

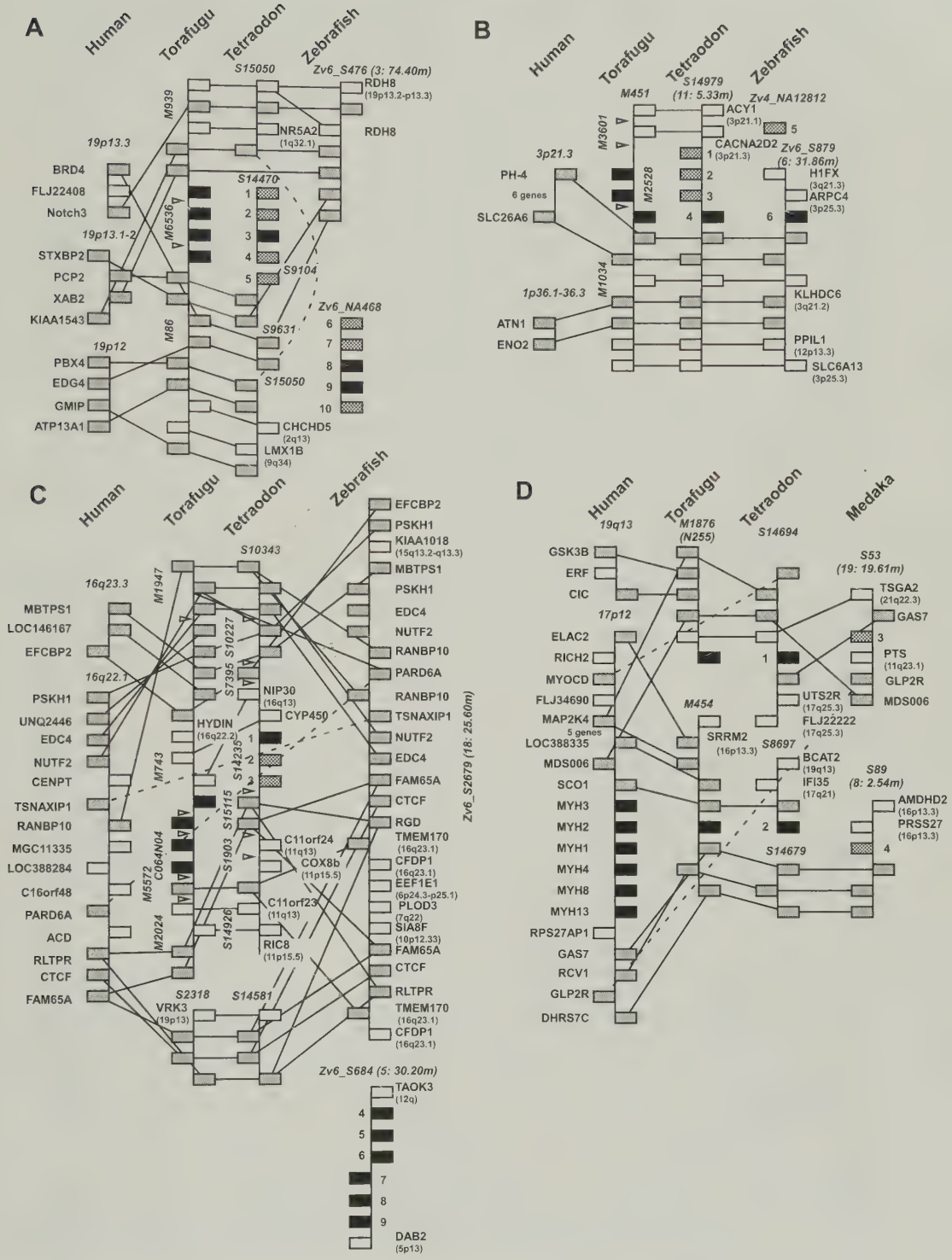


Fig. 1. Physical maps of human, torafugu, Tetraodon and zebrafish syntenic regions containing fast skeletal myosin heavy chains (*MYHs*). Data cited from Ikeda et al. (2007). Gray and open rectangles indicate syntenic and non-syntenic genes between fish and human, respectively. *MYHs* of torafugu and human are shown as filled rectangles. *MYHs* of Tetraodon, zebrafish and medaka are shown as filled and checked rectangles with numbers, which contain complete and incomplete genes, respectively. Genes displayed on the right of the midline are in forward strand (+ orientation, from top down), while those on the left are in reverse strand (− orientation, from bottom up). (A, B, C), no *MYH* is present in the human syntenic regions. (D), only a single *MYH* is contained in the torafugu and Tetraodon syntenic regions of human containing fast skeletal *MYHs* cluster. Although zebrafish syntenic regions of human *MYHs* cluster were not found, we found corresponding regions in medaka (panel D). Arrowheads indicate the boundary between two scaffold sequences.

うち胚に発現する速筋および遅筋タイプの *MYH* をそれぞれ、MYH_{M743-2} および MYH_{M5} と同定した。これらについては、胚における局在を *in situ hybridization* で明らかにし、MYH_{M743-2} が速筋、MYH_{M5} が遅筋と心筋に特異的であることを示した（Figure 2）（Ikeda et al., 2007）。次に、トラフグ成体の様々な部位の筋肉から、MYH をコードする cDNA のランダムクローニングを行い、MYH アイソフォームの組成を検討した。その結果、成体の速筋、遅筋および心筋において、複数の MYH アイソフォームが混在するが、その組成は筋肉間で異なることが示され、それぞれの筋組織で優先的に発現するアイソフォームが同定された。本結果はノーザンブロット解析でも支持された。MYH_{M743-2} および MYH_{M5} については、上流配列をゲノムデータベースから抽出し、ゼブラフィッシュ胚を用いた *in vivo* レポーター解析を行った。遅筋と心筋に特異的な MYH_{M5} につき、翻訳開始点から上流 4kb を連結したレポーターベクターの導入により、ゼブラフィッシュ胚の表皮直下の遅筋線維と心室の心筋細胞でレポーター遺伝子の発現が観察された。さらに、欠損変異体を導入することで、特異的な発現パターンは上流 1-2kb のシス制御を受けることが示された。同様の解析で、速筋特異的に発現する MYH_{M743-2} についても、翻訳開始点から上流 2kb がその発現に必要であることが示された。

性決定遺伝子の探索

雌と雄という性の二型は，多くの生物に認められる進化的に保存された現象である。しかし、雌雄の決定は、性決定遺伝子に依存する種から環境要因による種まで知られており、性決定機構には不明な点が多く残されている。脊椎動物においては、1991 年にほとんどの哺乳類の性を決定している遺伝子 SRY が同定されたが、哺乳類以外の種には当てはまらなかった（Capel, 2000）。2002 年に脊椎動物としては 2 番目となる性決定遺伝子 DMY がメダカで同定されたが（Matsuda et al., 2002）、この遺伝子はメダカの近縁種以外では存在しないことが示されており、魚類を含む多くの動物の性決定遺伝子は不明のままである。トラフグは，水産上重要な魚種であり、雄の精巣は食品としての市場価値が高い。我々の研究により、トラフグの性は、LG19 上に存在していて XX-XY 型の遺伝様式を示す単一のゲノム領域に支配されており、雄決定遺伝子座 SDY（Figure 3）を決定することができた（Kikuchi et al., 2007）。その領域には 280 個以上の予想遺伝子が存在していた。この連鎖解析の過程で、ある 1 つの家系において、遺伝子型が XX 型であるにもかかわらず精巣を持つ個体が見つかった。このことから、トラフグの性は、LG19 上の性決定遺伝子以外の要因でも決定される場合があることが示された。

おわりに

トラフグは、そのコンパクトなゲノムサイズから、脊椎動物のゲノムの構造や機能、進化を考察する比較ゲノム解析のモデルとして注目されてきた。一方で、トラフグは我が国において最高級の食用魚であり、養殖も盛んに行われている。基礎的にも応用的にも、トラフグは重要かつ魅力的な研究対象である。

我々が目指した高成長に関連する遺伝子座を同定する QTL 解析はまだ途中にあり、その形質には複数の遺伝子座が関与することが示唆されたものの、候補遺伝子座は絞り込めていない。今後、F2 集団を用いた解析を進め、遺伝子座を同定するとともに、本研究で明らかにした MYH アイソフォームなど筋特異的遺伝子の発現制御との関連を明らかにしたい。また、性決定遺伝子座が同定されたが、遺伝子そのものは同定できていない。当該遺伝子座には他生物種で既報の性決定遺伝子は検索されず、トラフグの性決定遺伝子の同定は、脊椎動物の新規の性決定機構の解明にもつながる大きな波及効果を持つ成果となることが期待される。一方で、当該遺伝子座に依らない性転換があることも示され、今後その機構を明らかにする必要がある。

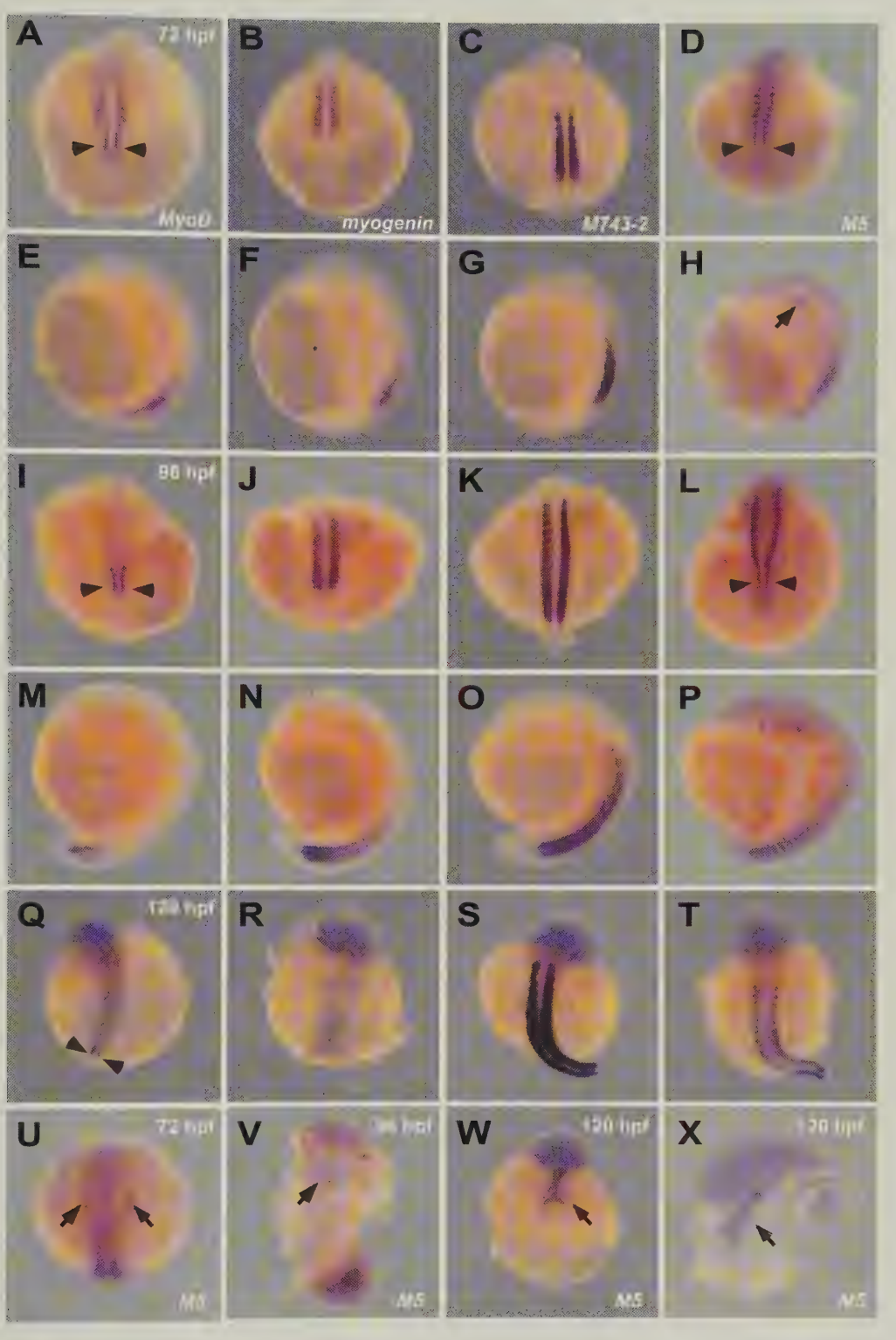


Fig. 2. Localization of the transcripts of fast skeletal myosin heavy chain gene (*MYH*), $MYHM_{743\text{-}2}$, and slow skeletal *MYH*, MYH_{M5}, in comparison with those of *MyoD* and *myogenin* in torafugu embryos. Data cited from Ikeda et al. (2007). (A–T), torafugu embryos were hybridized with probes specific to MyoD (A, E, I, M, Q), myogenin (B, F, J, N, R), $MYH_{M743\text{-}2}$ (C, G, K, O, S) and MYH_{M5} (D, H, L, P, T) at 72 (A–H), 96 (I–P) and 120 (Q–T) hours post fertilization (hpf). Dorsal (A–D, I–L, Q–T) and lateral views (E–H, M–P) are shown. (U–X), the transcripts of slow skeletal MYH_{M5} in developing myocardium at 72 (U), 96 (V) and 120 (W, X) hpf. Dorsal view (U), ventral view after removing the yolk (V), anterior view (W) and anterolateral view (X) are shown. Arrowheads and arrows indicate adaxial cells (A, D, I, L, Q) and developing myocardium (bilateral heart precursor cells, H and U; heart cone, V; heart tube, W and X), respectively.

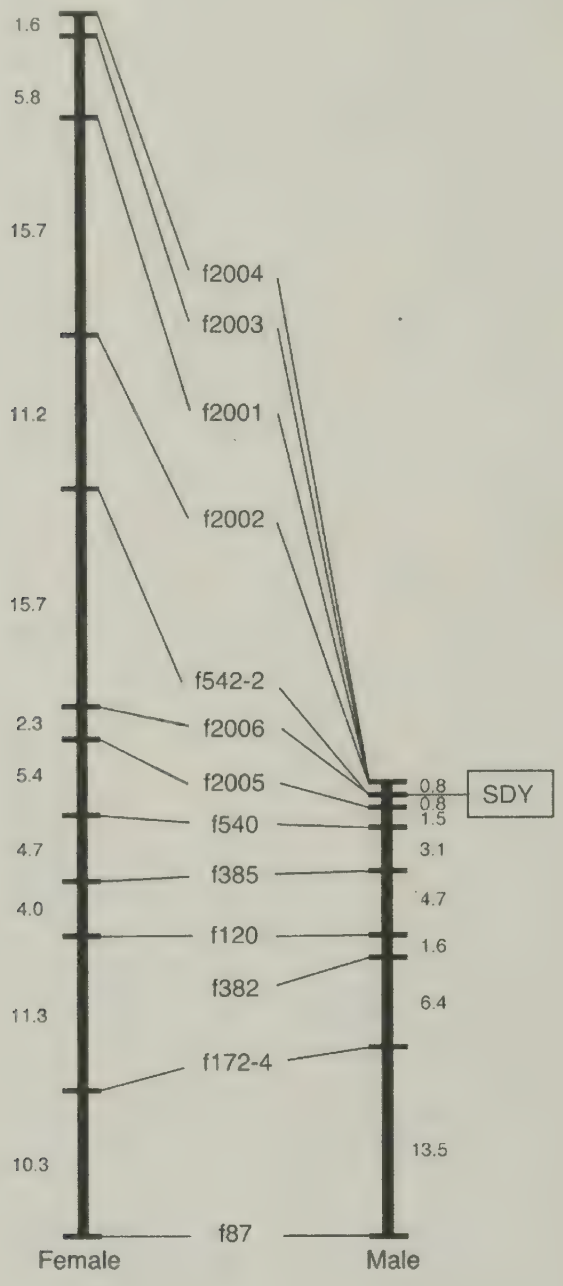


Fig. 3. Male and female meiotic maps of torafugu LG19. Data cited from Kikuchi et al. (2007). The markers f2006, f542-2, and SDY (the locus determining male sex phenotype) showed no recombination. Genetic maps were generated using 75 males and 55 females from family 1. Allelic bridges are indicated with a line connecting female (left) and male (right) linkage maps. Genetic distances in centimorgans between adjacent markers are shown. The microsatellite loci were chosen by scanning scaffolds on electronic resources available from the Joint Genome Institute (http://genome.jgi-psf.org/Takru4/Takru4.home.html).

文　献

Brenner, S., Elgar, G., Sandford, R., Macrae, A., Venkatesh, B., and Aparicio, S., 1993: Characterization of the pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature*, **366**, 265–268.

Capel, B., 2000: The battle of the sexes. *Mech. Dev.*, **92**, 89–103.

Furukawa, S., Takeshima, H., Otaka, T., Mitsuboshi, T., Shirasu, K., Ikeda, D., Kaneko, G., Nishida, M., and Watabe, S., 2004: Isolation of microsatellite markers by *in silico* screening implicated for genetic linkage mapping in Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Fish. Sci.*, **70**, 620–627.

池田大介，渡部終五，2004: フグゲノム：脊椎動物で最も小さいサイズ．蛋白質 核酸 酵素，**49**, 2235–2241.

Ikeda, D, Clark, M. S., Liang, C. S., Snell, P., Edwards, Y. J. K., and Watabe, S., 2004: Genomic structural analysis of the pufferfish (*Takifugu rubripes*) skeletal myosin heavy chain genes. *Mar. Biotechnol.*, **6**, S462–S467.

Ikeda, D., Ono, Y., Snell, P., Edwards, Y. J., Elgar, G., and Watabe, S., 2007: Divergent evolution of the myosin heavy chain gene family in fish and tetrapods: evidence from comparative genomic analysis. *Physiol. Genomics*, **32**, 1–15.

Kai, W., Kikuchi, K., Fujita, M., Suetake, H., Fujiwara, A., Yoshiura, Y., Ototake, M., Venkatesh, B., Miyaki, K., and Suzuki, Y., 2005: A genetic linkage map for the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics*, **171**, 227–238.

Kikuchi, K., Kai, W., Hosokawa, A., Mizuno, N., Suetake, H., Asahina, K., and Suzuki, Y., 2007: The sex-determining locus in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics*, **175**, 2039–2042.

Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., et al., 2002: DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, **417**, 559–563.

Watabe, S. and Ikeda, D., 2006: Diversity of the pufferfish *Takifugu rubripes* fast skeletal myosin heavy chain genes. *Comp. Biochem. Physiol. D Genomics Proteomics*, **1**, 28–34.

水研センター研報，第24号，91－97，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 91－97, 2008

報　文

魚類における卵黄の蓄積・分解・利用機構の解明

松原孝博[*1]・大久保信幸[*1]・澤口小有美[*1]・玄　浩一郎[*2]

Accumulation, degradation and utilization of yolk proteins in teleosts.

Takahiro MATSUBARA[*1], Nobuyuki OHKUBO[*1],
Sayumi SAWAGUCHI[*1], and Koichiro GEN[*2]

Abstract Vitellogenin (Vg) is the precursor of egg yolk proteins in teleost species. Three forms of Vg genes and their transcripts appear to exist in barfin flounder, mosquitofish, and red seabream consisting of two forms of complete Vg (VgA and VgB) and a smaller Vg lacking a phosvitin domain (PvlVg, VgC). From cDNA sequencing analysis of the Vg gene, we clarified that species belonging to higher taxa, including Acanthopterygii and Paracanthopterygii, express all three forms of VgA, VgB and VgC. Both VgA and VgB cleaved into three classes of yolk proteins: lipovitellin, phosvitin and β'-component when they are incorporated into oocytes. VgA and VgB play distinct roles in the regulation of egg buoyancy in barfin flounder through selective proteolysis of their derivative yolk proteins in oocytes undergoing final oocyte maturation. Involvement of a cathepsin B-like enzyme in this maturation associated proteolysis was demonstrated by protease specification procedures. Measurement of ooplasm pH at different stages of oocyte maturation revealed drastic acidification of the ooplasm accompanied with yolk protein proteolysis and activation of cathepsin B. With respect to oocyte hydration for acquisition of egg buoyancy, cytoplasmic maturation events appear to be controlled by changes in the pH in maturating oocytes.

Key words : teleost, egg, vitellogenin, yolk protein, oocyte maturation

卵生脊椎動物では，胚発生に必要な栄養を予め卵内に蓄積している。卵内の栄養は卵黄と総称され，その主な成分は卵黄タンパクである。魚類においても卵生魚およびほとんどの胎生魚の卵で，卵黄タンパクは胚発生に不可欠な要素であり，その合成，蓄積，利用に関する研究は，増養殖における種苗生産を効率的に進める上で重要な情報をもたらす。近年，多くの水産増養殖対象魚種において種苗生産の基盤技術が確立しつつあり，次の段階として，より効率的な生産や遺伝的多様性に配慮した高度な生産技術が求められている。その中で，「卵質」の問題が改めて浮上し，健康で遺伝的にも多様な種苗を効率的に作るためには良い卵を得ることが極めて重要であると再認識されている。

魚類の卵黄タンパクは前駆体であるビテロジェニン（vitellogenin）として成熟期の雌の肝臓で合成される（Fig. 1）。発達を開始した卵巣で合成される雌性ホルモン（estradiol-17 β）は肝細胞にあるエストロジェン受容体を仲介して，そこでビテロジェニン合成を誘導する。作られたビテロジェニンは血液によって卵巣に運ばれ，卵母細胞に取り込まれて卵黄タンパクとして蓄積される（Wallace, 1985 参照）。こうして蓄積された卵黄タンパクは胚発生のためのエネルギー源および胚を構築する原材料として用いられると考えられてきた。しかしながら，1980 年代から 90 年代に海産魚の浮遊性卵で遊離アミノ酸含有量が著しく高いことや，最終成熟期に卵黄タンパクに変化が見られることが

2008 年 4 月 23 日 受理 (Received on April 23, 2008)
[*1] 独立行政法人水産総合研究センター北海道区水産研究所，〒 085-0802 北海道釧路市桂恋 116　(Hokkaido National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, 116, Katsurakoi, Kushiro, Hokkaido 085-0802, Japan)
[*2] 独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所玉城庁舎　〒 519-0423　三重県度会郡玉城町昼田 224-1
(National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, 224-1 Hiruta, Tamaki, Mie 519-0423, JAPAN)

示され (Craik and Harvey, 1987; McPherson *et al.*, 1989; Greeley *et al.*, 1991)，卵の浮遊性獲得への関与が浮き彫りになってきた。そのため，我々はバイオデザイン計画の中で，これらの断片的な情報を統合し，海産浮遊性卵における卵黄タンパクの合成から利用に至る全過程について研究を進めてきたことから，ここでは一連の成果を報告する。

硬骨魚類におけるビテロジェニンの多型

鳥類や両生類のビテロジェニンに多型が見られることは知られていたが (Wiley and Wallace, 1978; Wang and Williams, 1980; Wang *et al.*, 1983)，魚類では比較的最近まで多型の存在は不明であった。硬骨魚類のビテロジェニンに複数の型のものが存在することは，マミチョグ *Fundulus heteroclitus* において VgI，VgII の 2 遺伝子が報告されたのが最初である (LaFleur *et al.*, 1995a; LaFleur *et al.*, 1995b; LaFleur *et al.*, 2005)。その後，我々はマツカワ *Verasper moseri* でマミチョグの VgI，VgII に対応するビテロジェニン (VgA と VgB) とその派生物である卵黄タンパクを見い出した (Matsubara *et al.*, 1999)。また，マミチョグやマツカワが属する棘鰭上目に加えて側棘鰭上目においてもスケトウダラ *Theragra chalcogramma* (Matsubara *et al.*, 2000) やハドック *Melanogrammus aeglefinus* (Reith *et al.*, 2001) で，VgA, VgB の遺伝子やタンパクが見つかっている。それらに対して，ニジマス *Oncorhynchus mykiss* のビテロジェニン (Mouchel *et al.*, 1996) やニホンウナギ *Anguilla japonica* の Vg1 (Okumura et al., 2002)，Vg2 (GenBank: AY423444) では，複数のビテロジェニン遺伝子は見られるものの，VgA と VgB のような大きな違いが認められない。Figure 2 に示すように，これら VgA (=VgI) と VgB (=VgII) や，ニジマスやウナギのビテロジェニン遺伝子は，大きさや内部の卵黄タンパクドメインの構造が類似しており，一般的かつ完全な形のビテロジェニンと位置付けられる。一方，それらよりも小さく，また内部構造が不完全なビテロジェニン遺伝子がゼブラフィッシュ *Danio rerio* で発見された (Wang *et al.*, 2000)。これは内部にホスビチン (phosvitin) を持たないことからホスビチンレス (phosvitinless) ビテロジェニンと名付けられている。我々も，マハゼ *Acanthogobius flavimanus* で通常のビテロジェニン (Vg 530) とホスビチンレスビテロジェニン (Vg-320) の 2 種類の遺伝子と血中のタンパクが存在することを見い出した (Ohkubo *et al.*, 2003; Ohkubo *et al.*, 2004)。棘鰭上目の魚類に，VgA と VgB に加えて，この 3 型目のビテロジェニン (VgC) が存在するか否かを検討し，ホワイトパーチ *Morone Americana* (Hiramatsu *et al.*, 2002b) で 3 型のタンパクが，カダヤシ *Gambusia affinis* (Sawaguchi *et al.*, 2005)，マダイ Pagrus major (Sawaguchi *et al.*, 2006a)，ボラ *Mugil cephalus* (Amano *et al.*, 2007a) で 3 型の遺伝子とタンパクを検出した (Fig. 2)。分類群の異なる魚種から 3 型のビテロジェニンが見出されていることから，これらのビテロジェニンは棘鰭上目に広く共通して存在すると考えられる。魚類を含めた卵生脊椎動物のビテロジェニンに多型が生じた原因については，染色体の倍加に起因する可能性が論じられている (Finn and Kristoffersen, 2007)。

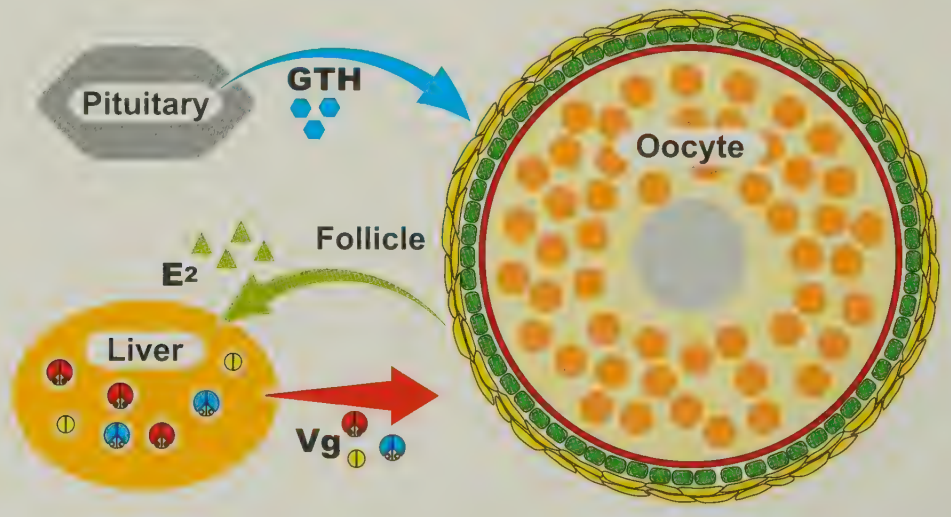


Fig. 1. Synthesis and accumulation of vitellogenin in major evolved teleosts. Vg: vitellogenin, E_2: estradiol-17 β, GTH: gonadotropic hormone.

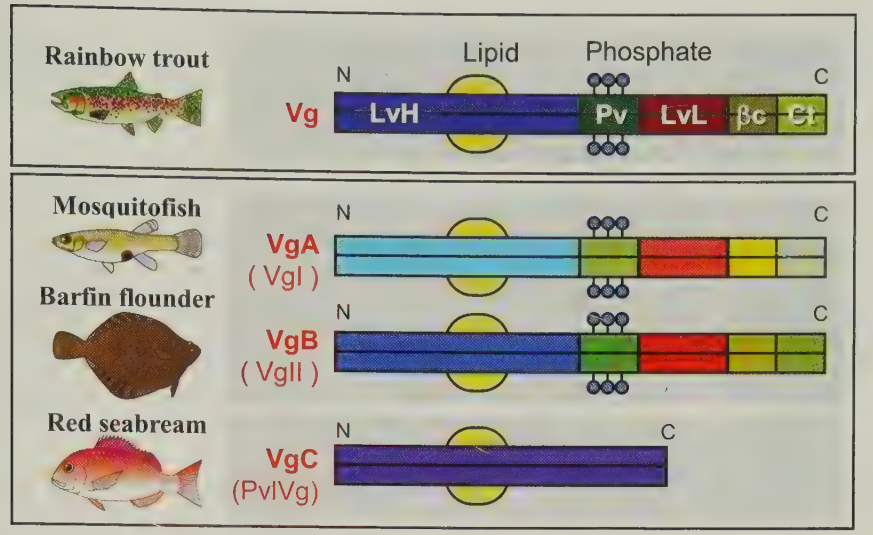


Fig. 2. Multi-forms of vitellogenin structure of teleosts. Vg: vitellogenin, PvlVg: phosvitinless Vg, LvH, lipovitellin heavy chain, Pv: phosvitin, LvL: lipovitellin light chain, β c: β' -component, Ct: C-terminal component.

魚類ビテロジェニンの遺伝子分析結果と卵黄タンパクの電気泳動分析およびN-末端アミノ酸配列分析の結果から，ビテロジェニン内部の卵黄タンパクドメイン構造を明らかにした (Hiramatsu *et al.*, 2002a; Matsubara *et al.*, 2003)。Figure 2 に示したように VgA，VgB を含む通常のビテロジェニンはアミノ末端側から順にリポビテリン重鎖 (lipovitellin heavy chain: LvH) －ホスビチン (phosvitin: Pv) －リポビテリン軽鎖 (lipovitellin light chain: LvL) － β' －成分 (β' -component: β c) － C-末端成分 (C-terminal component: Ct) を含む。このように類似した内部構造を持ちながらも VgA と VgB の間のアミノ酸の相同性は高くはなく，異なる種間であっても VgA 間あるいは VgB 間の相同性はそれに比べて高い。これは，後で述べる VgA と VgB の機能の分化と密接に関係しているものと思われる。VgA，VgB とは異なり，VgC の内部にはセリンを多く含んだホスビチンの領域が存在せず，LvL 以降の領域も短縮されている。全体のサイズもカダヤシを例にとると VgA がアミノ酸 1,695 残基（シグナルペプチド15残基を含む)，VgB がアミノ酸 1,675 残基であるのに対し，VgC はアミノ酸 1,242 残基と小さい。VgC はこのように内部ドメイン構造が他のビテロジェニンと大きく異なることやサイズが小さいことに加え，VgA，VgB に対するアミノ酸の相同性も低く，カダヤシでは VgA との間で 17%，VgB との間で 21%にしか満たない (Sawaguchi *et al.*, 2005)。

海産魚の卵の浮遊性調節への多型ビテロジェニンの関与

マツカワは浮遊性の大きな卵を生む海産魚で，雌は約1ヶ月の産卵期の間に3～4日周期で排卵をくり返す (Koya *et al.*, 1994)。マツカワの卵には肉眼で見えるような油球は存在しない。そのため卵の浮遊性は，卵黄タンパクを分解して生じた遊離アミノ酸による浸透圧上昇を利用して顕著な吸水を引き起こし，卵の比重を海水と同等まで下げることで獲得することが示唆された (Matsubara and Sawano, 1995; Matsubara and Koya, 1997)。さらに我々は，マツカワで最終成熟期に VgA と VgB に由来する卵黄タンパクを不均等に分解することで卵の浮力を調節する2型ビテロジェニンによる調節機構 (Dual-Vg control system，Fig. 3) を見出した (Matsubara *et al.*, 1999)。マツカワの卵母細胞は卵黄形成期に VgA と VgB を取り込み，卵黄タンパク（リポビテリン，ホスビチン，β－成分）を蓄積する。リポビテリンは質量の約 20%の脂質を含むリポプロテインで，分子量は VgA 由来のリポビテリン（LvA）では約 430 kDa，VgB 由来の LvB では約 400 kDa であり，それぞれ重鎖（vLvH）と軽鎖（vLvL）を各々2本ずつ含む。一方，ホスビチン（Pv）は内部にリン酸を結合したセリンの繰り返し配列を含む特殊なタンパクで，マツカワでは脱リン酸化した分子量は VgA 由来の PvA で 7 kDa，VgB 由来の PvB で 15 kDa と 8 kDa である (Sawaguchi *et al.*, 2006b)。また，β－成分は SDS-電気泳動では VgA，VgB 由来のいずれも約 19 kDa の分子量を持つ (Matsubara and Sawano, 1995)。

マツカワの卵母細胞では，最終成熟期になるとこれ

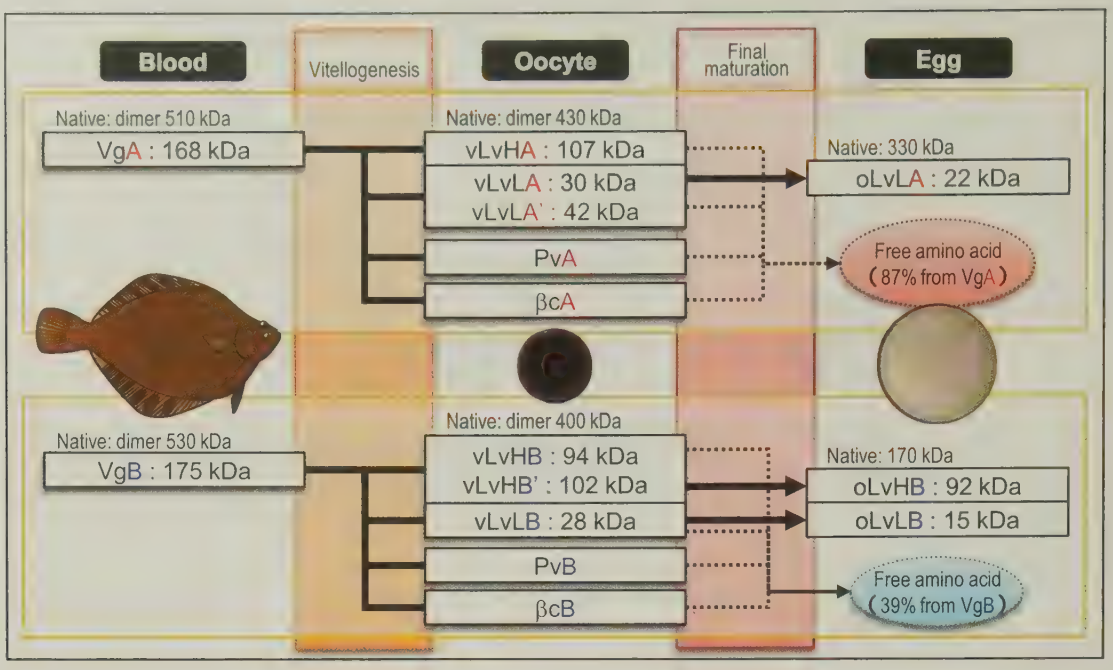


Fig. 3. Dual-Vg control system in barfin flounder *Verasper moseri* (modified figure from Matsubara et al., 1999). Vg: vitellogenin, LvH, lipovitellin heavy chain, Pv: phosvitin, LvL: lipovitellin light chain, β c: β'-component, Ct: C-terminal component, v: component from vitellogenic oocyte, o: component from ovulated egg.

ら卵黄タンパクに著しい変化が見られる。Figure3 に示すように，Pv とβ c は VgA, B いずれの由来のものも最終成熟期に分解され，排卵卵では見られなくなる。一方，Lv については，LvA は重鎖全体と軽鎖の一部が分解され，22 kDa の軽鎖（oLvLA）のみが脂質と結合したまま残る。それに対して，LvB は重鎖，軽鎖共に一部分を失うにとどまり，それぞれ 92 kDa の oLvHB と 15 kDa の oLvLB に変化し，各々のポリペプチド鎖 1 本と脂質からなる構造へと変化する。これにより，ゲルろ過での分子量は最終成熟前の 430 kDa から 170 kDa へと半減する。このように LvA と LvB が不均等な分解を受けることで，VgA からは全体の 87%が，VgB からは 39%が遊離アミノ酸へと分解される。卵黄タンパクの分解と，それによる遊離アミノ酸の増加は最終成熟中盤以降顕著に起こり，それと同期して卵母細胞内への水の移入が起こる。このことから，卵黄タンパクを限定的に分解し，それにより生じた一定量の遊離アミノ酸を主な浸透圧上昇因子として利用し，吸水を引き起こすことで卵の浮遊性を獲得，調節していることが明らかになった。最終成熟期の吸水の際に，アクアポリン（aquaporin）が水の通り道として利用されていることがヨーロッパヘダイ *Sparus aurata* で最近明らかにされた（Fabra *et al.*, 2005）。

こうした卵の浮遊性獲得機構はマダイ（Sawaguchi *et al.*, 2006a），ボラ（Amano *et al.*, 2007b），スケトウダラ（Ohkubo et al., 2006）でも見られ，VgA，VgB を持つ高等な魚種に共通していると考えられる（Matsubara *et al.*, 2003）。この機構で最も重要な点は，2 種類のビテロジェニン（VgA と VgB）由来の卵黄タンパクを正確に一定の比率で卵母細胞内に蓄積する必要がある点であり，そのための調節機構が存在するものと推察される。

卵の浮遊性獲得の生理的調節機構

最終成熟期に起こる卵黄タンパク分解の複雑なプロセスには，限定的な分解を引き起こすプロテアーゼの活性化とその活性調節を行う卵内 pH の制御が主として働く（Fig. 4）。種々のプロテアーゼ阻害剤を用いた実験およびシステインプロテアーゼに対する人工基質を用いて最終成熟期の卵黄タンパク分解に関するタンパク分解酵素の活性を調べた結果，カテプシン B（cathepsin B）と思われる活性が最終成熟期中盤以降の卵母細胞で高まることが示された。このカテプシン B 様酵素の至適 pH を調べたところ pH 5.5 付近であり（松原ら，未発表），ほ乳類などのカテプシン B の至適 pH と近い値を示した。カテプシン B の活性化の引き金は明らかではないが，活性化と時期を同じくして卵母細胞内 pH が 5.9 から 5.0 程度へと引き下げられ，酵素の至適 pH に保たれている（Matsubara *et*

al., 2003)。ブラックシーバス *Centropristes striata* では最終成熟期の吸水にATP-依存性プロトンポンプが関与していることが示されている(*Selman et al.*, 2001)。従って，マツカワで見られた卵母細胞内のpH降下は，このプロトンポンプの働きによるものと推察される，カテプシンBの活性化が卵母細胞内部のpHのみで直接的に調節されているか否かは今後に残された課題である。

制御機構のもう1つの柱はVgAとVgBの一定比率での卵母細胞への取り込みにある。先に述べたようにマツカワをはじめ棘鰭上目の魚類ではVgA，VgBに加えてVgCが存在する。マツカワで，これら3種のビテロジェニンそれぞれに由来するリポビテリンの定量的分析を行うため，各々の特異的免疫測定系を作製した。それらを用いて卵母細胞，血液，肝臓中のビテロジェニンまたはリポビテリンを測定したところ，卵母細胞中ではVgA，VgBおよびVgC由来のリポビテリンが一定比率で蓄積されているものの，血液，肝臓での比率は必ずしもそれと一致せず，合成・分泌および取り込みの複数箇所で調節されていることがうかがわれた(澤口ら，未発表データ)。

おわりに

このプロジェクトでは，マツカワで見られたような卵黄タンパクの機能が，魚類のどの分類群に共通し，どの群では異なるのか，多型ビテロジェニンの遺伝子解析と生化学的な分析からビテロジェニンの機能的進化を明らかにする試みも実施している。こうしたことがわかることで，栽培漁業などで対象としている魚種の卵がどのような性質を持ったものか判断する基準となる。また，3つの型のビテロジェニンが卵母細胞に取り込まれる比率を一定に調節する機序については，明らかにするまでには至らなかったが，その個体群が利用する産卵場の塩分濃度などの環境で卵が適切な浮遊性を持つように，取り込み比率が遺伝的に決定つけられている可能性がある。こうした卵の物理的特性の遺伝性についても，今後，栽培漁業による遺伝的な攪乱を防ぐ上で明らかにすべき問題であると考えられる。

参考文献

Amano, H., Fujita, T., Hiramatsu, N., Sawaguchi, S., Matsubara, T., Sullivan, C., and Hara, A., 2007a: Purification of multiple vitellogenins in grey mullet (*Mugil cephalus*). *Mar. Biol.*, **152**, 1215-1225.

Amano, H., Fujita, T., Hiramatsu, N., Shimizu, M., Sawaguchi, S., Matsubara, T., Kagawa, H., Nagae, M., Sullivan, C. V., and Hara, A., 2007b: Egg yolk proteins in grey mullet (*Mugil cephalus*): purification and classification of multiple lipovitellins and other vitellogenin-derived yolk proteins and molecular cloning of the parent vitellogenin genes. *J. Experiment. Zool. A, 307A*, **324**-341.

Craik, J. C. A. and Harvey, S. M., 1987: The causes of buoyancy in eggs of marine teleosts. *F. Mar. Boil. Ass. U. K.*, **67**, 169-182.

Fabra, M., Raldua, D., Power, D. M., Deen, P. M. T.,

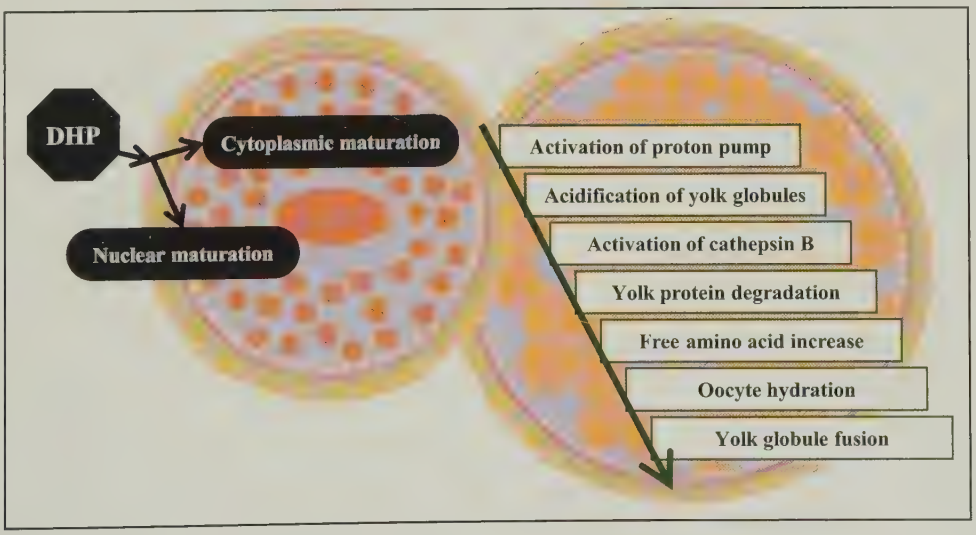


Fig. 4. Process of yolk protein digestion and hydration on oocyte maturation. DHP: 17 α ,20 β -dihydroxy- 4-pregnen-3-one.

and Cerda, J., 2005: Marine Fish Egg Hydration Is Aquaporin-Mediated. *Science*, **307**, 545.

Finn, R. N. and Kristoffersen, B. A., 2007: Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the "3R hypothesis": correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts. *PLoS ONE*, **2**, e169.

Greeley, M. S., Hols, H., and Wallace, R. A., 1991: Changes in size, hydration and low molecular weight osmotic effectors during meiotic maturation of *Fundulus oocytes in vivo*. *Comp. Biochem. Physiol.* A, **100**, 639-647.

Hiramatsu, N., Matsubara, T., Weber, G. M., Sullivan, C. V., and Hara, A., 2002a: Vitellogenesis in aquatic animals. *Fish. Sci.*, **68**, 694-699.

Hiramatsu, N., Matsubara, T., Hara, A., Donato, D. M., Hiramatsu, K., Denslow, N. D., and Sullivan, C. V., 2002b: Identification, purification and classification of multiple forms of vitellogenin from white perch (*Morone americana*). *Fish Physiol. Biochem.*, **26**, 355-370.

Koya, Y., Matsubara, T., and Nakagawa, T., 1994: Efficient artificial fertilization method based on the ovulation cycle in barfin flounder *Verasper moseri*. *Fish. Sci.*, **60**, 537-540.

LaFleur, G. J. J., Byrne, B. M., Haux, C., Greenberg, R. M., and Wallace, R. A., Liver-derived cDNAs: Vitellogenins and vitelline envelope protein precursors (choriogenins). In: Goetz, F. W. and Thomas, P., Eds.), Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Fish Symposium 95, Austin, University of Texas, Austin, U.S.A, 1995a, pp. 336-338.

LaFleur, G. J. J., Byrne, B. M., Kanungo, J., Nelson, L., Greenberg, R. M., and Wallace, R. A., 1995b: *Fundulus heteroclitus* vitellogenin: The deduced primary structure of a piscine precursor to noncrystalline, liquid-phase yolk protein. *J. Mol. Evol.*, **41**, 505-521.

LaFleur, G. J. J., Raldua, D., Fabra, M., Carnevali, O., Denslow, N., Wallace, R. A., and Cerda, J., 2005: Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenins and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Reprod.*, **73**, 815-824.

Matsubara, T. and Sawano, K., 1995: Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*). *J. Exp. Zool.*, **272**, 34-45.

Matsubara, T. and Koya, Y., 1997: Course of proteolytic cleavage in three classes of yolk proteins during oocyte maturation in barfin flounder *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs. *J. Exp. Zool.*, **278**, 189-200.

Matsubara, T., Ohkubo, N., Andoh, T., Sullivan, C. V., and Hara, A., 1999: Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev. Biol.*, **213**, 18-32.

Matsubara, T., Ohkubo, N., Andoh, T., Sullivan, C. V., and Hara, A., Involvement of dual-vitellogenin system in the control mechanism of egg buoyancy in barfin flounder and walleye pollock. 6th international symposium on the reproductive physiology of fish, Bergen, 2000, pp. 305.

Matsubara, T., Nagae, M., Ohkubo, N., Andoh, T., Sawaguchi, S., Hiramatsu, N., Sullivan, C. V., and Hara, A., 2003: Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts. *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 295-299.

McPherson, R., Greeley, M. S. J., and Wallace, R. A., 1989: The influence of yolk protein proteolysis on hydration in the oocytes *of Fundulus heteroclitus*. *Develop. Growth Differ.*, **31**, 475-483.

Mouchel, N., Trichet, V., Betz, A., Le Pennec, J. P., and Wolff, J., 1996: Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene*, **174**, 59-64.

Ohkubo, N., Mochida, K., Adachi, S., Hara, A., Hotta, K., Nakamura, Y., and Matsubara, T., 2003: Development of enzyme-linked immunosorbent assays for two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **131**, 353-364.

Ohkubo, N., Andoh, T., Mochida, K., Adachi, S., Hara, A., and Matsubara, T., 2004: Deduced primary structure of two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **137**, 19-28.

Ohkubo, N., Sawaguchi, S., Hamatsu, T., and Matsubara, T., 2006: Utilization of free amino acids, yolk protein and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of walleye pollock *Theragra chalcogramma*. *Fish. Sci.*,

72, 620–630.

Okumura, H., Todo, T., Adachi, S., and Yamauchi, K., 2002: Changes in hepatic vitellogenin mRNA levels during oocyte development in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **125**, 9–16.

Reith, M., Munholland, J., Kelly, J., Finn, R. N., and Fyhn, H. J., 2001: Lipovitellins derived from two forms of vitellogenin are differentially processed during oocyte maturation in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *J. Exp. Zool.*, **291**, 58–67.

Sawaguchi, S., Koya, Y., Yoshizaki, N., Ohkubo, N., Andoh, T., Hiramatsu, N., Sullivan, C. V., Hara, A., and Matsubara, T., 2005: Multiple vitellogenins (Vgs) in mosquitofish (*Gambusia affinis*): Identification and characterization of three functional Vg genes and their circulating and yolk protein products. *Biol. Reprod.*, **72**, 1045–1060.

Sawaguchi, S., Kagawa, H., Ohkubo, N., Hiramatsu, N., Sullivan, C. V., and Matsubara, T., 2006a: Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. *Mol. Reprod. Dev.*, **73**, 719–736.

Sawaguchi, S., Ohkubo, N., and Matsubara, T., 2006b: Identification of two forms of vitellogenin-derived phosvitin and elucidation of their fate and roles during oocyte maturation in the barfin flounder, *Verasper moseri*. *Zool. Sci.*, **23**, 1021–1029.

Selman, K., Wallace, R. A., and Cerda, J., 2001: Bafilomycin A1 inhibits proteolytic cleavage and hydration but not yolk crystal disassembly or meiosis during maturation of sea bass oocytes. *J. Experiment. Zool.*, **290**, 265–278.

Wallace, R. A., 1985: Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In "Oogenesis" (ed. Browder, L. W.), Vol.1, Plenum Press, New York, pp. 127–177.

Wang, S. Y. and Williams, D. L., 1980: Identification, purification, and characterization of two distinct avian vitellogenins. *Biochem.*, **19**, 1557–1563.

Wang, S. Y., Smith, D. E., and Williams, D. L., 1983: Purification of avian vitellogenin III: Comparison with vitellogenins I and II. *Biochem.*, **22**, 6206–6212.

Wang, H., Yan, T., Tan, J. T. T., and Gong, Z., 2000: A zebrafish vitellogenin gene (*vg3*) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. *Gene*, **256**, 303–310.

Wiley, H. S. and Wallace, R. A., 1978: Three different molecular weight forms of the vitellogenin peptide from *Xenopus laevis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 153–159.

水研センター研報，第24号，99－105，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 99－105, 2008

報　文

生殖細胞移植を用いた魚類遺伝子資源保存法の開発

吉崎悟朗*

Germ cell transplantation in fish: A novel approach for conservation of genetic resources

Goro YOSHIZAKI

Abstract To date, we do not have any cryopreservation method for fish eggs and embryos. Therefore, there is no available system to preserve fish genetic resources other than raising live individuals in captivity. To overcome this obstacle, we recently established a system to cryopreserve trout spermatogonia using slow-freezing method. In order to convert isolated spermatogonia into functional gametes, we established a novel spermatogonial transplantation method. Spermatogonia from male trout were transplanted into the peritoneal cavity of newly hatched sterile triploid salmon. The transplanted trout spermatogonia migrated towards the recipient salmon genital ridges, and were subsequently incorporated into them. In male recipients, transplanted spermatogonia underwent spermatogenesis. Further, in female recipients, transplanted spermatogonia underwent oogenesis. At 2 years after transplantation, sterile salmon recipients only produced donor-derived trout sperm and eggs. By artificial insemination with the sperm and eggs obtained from the triploid salmon recipients, only the donor-derived trout offspring was successfully produced. Thus, the transplanted trout germ cells proliferated and matured normally in a xenogeneic microenvironment. Combined with cryopreservation of spermatogonia, the xeno-transplantation technique would make it possible to preserve fish genetic resources and to revive extinct species using closely related species as a surrogate when necessary.

Key words : spermatogonia, primordial germ cell, vasa, endangered species, surrogate broodstock

近年、地球規模での環境破壊と乱獲により、多くの水産生物の資源量が減少し、一部の種では絶滅の危機に瀕しているものも少なくない。サケ科魚類も例外ではなく、北米ではブルトラウト（*Salvelinus confluentus*）やゴールデントラウト（*Oncorhynchus aguabonita whitei*）等が絶滅危惧種に指定されている。また、種としては十分な数が残されてはいるものの、地域個体群として絶滅が危惧されている集団も少なくない。サケ科魚類、特に陸封された集団は他の河川に分布する集団と遺伝的に交流することがないため、各地域個体群が独自の分化をとげている例も多く見受けられる。わが国のイワナ類も多くの研究者が異なる亜種に細分化することを提唱しているが、これは各地域の集団ごとに異なった斑紋や色彩変異を有するためである。日本のイワナ類もレッドデータブックに記載されている地域個体群が少なくない。このように日本のイワナ類が減少してしまった理由に、河川環境の悪化が挙げられる。砂防ダムの建設や流域の開発に伴い、イワナの生息環境が悪化していることは間違いないが、それに加えもう一つの大きな問題は、無計画な人口種苗の河川放流である。先に述べたように、多くの陸封型サケ科魚類はそれぞれの河川環境に応じた適応がなされてきたわけであるが、人口種苗をその起源を考慮せずに放流することで、各地域個体群の遺伝子資

2008年4月23日受理　(Received on April 23, 2008)
＊東京海洋大学　海洋科学部　海洋生物資源学科　〒108-8477　東京都港区港南4-5-7
(Tokyo University of Fisheries, 4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan)

源が大いに撹乱されている点も見逃せない事実である。

このような現状において、これらサケ科魚類の遺伝子資源の保全は極めて早急に対応すべき重要な課題である。当然、第一に行うべきことは生息環境を修復することでであることは間違いのない事実であるが、多くの場合、環境修復には極めて長い時間を要する。特に砂防ダム等の人口建設物が魚類の生息域に存在する場合、その撤去は現実的には不可能であるうえ、水質改善も長期間を要する。このような現状において、絶滅危惧種を守るためにはなんらかのバックアップとなる技術開発が重要である。

魚類細胞の凍結保存

絶滅危惧種保全のバックアップ技術としては、卵や精子の凍結保存が、まず第一に挙げられる。しかし、魚類では精子の凍結保存は可能になっているものの、卵の大きさが極めて大きく（凍結保存が可能になっている一部の哺乳動物の卵と比べ、その大きさ（重量）は1000倍以上である）、脂肪分に富むため、その凍結保存技術が全く開発されていない（Chao and Liao, 2001）。精子を凍結保存しておき、これを雄性発生（γ線照射により遺伝的に不活性化した卵へと凍結精子を受精させ、得られた受精卵の第一卵割を阻害することで2Nの個体を作出する方法）により個体を作成するというアプローチも考えられるが（荒井, 1997）、この場合ミトコンドリアのDNAは卵を提供する魚種に由来することとなり、得られた個体は、核DNAとミトコンドリアDNAが異種に由来する人為雑種となり、これらを自然界へと放流することは望ましくない。また、体細胞を液体窒素中で凍結保存しておき、必要な際に異種の卵へと核移植することにより個体を作出するというアプローチも考えられるが（若松・尾里, 2002）、この場合も雄性発生と同様、細胞質中のミトコンドリアDNAは卵を提供した異種に由来するため、あくまでも核細胞質雑種しか作成することはできない。もうひとつの可能性は胚細胞の凍結保存である（Kusuda, 2004）。これは、初期胚の割球を卵黄から単離して凍結保存し、必要な際に宿主胚に移植することで（宿主の胚の割球と混ぜる）、宿主由来の卵黄を利用して移植細胞と宿主細胞が混在したキメラ個体を作成するという方法である。これらの割球移植は今までに多くの水産上有用種で試みられており、キメラ個体が成熟し、効率的に移植細胞由来の卵や精子を生産する場合は、魚類遺伝子資源保存の有効な方法になると期待される。しかし、絶滅危惧種由来の初期胚の採集は現実的には容易ではなく、本法の応用は人為管理下での飼育や再生産が可能な魚種に限定される。そこで筆者らは、生殖細胞を凍結保存し、これを宿主個体内で卵や精子にまで成熟させる方法を考案した。

始原生殖細胞移植

2004年に筆者らの研究室では、性的に未分化な始原生殖細胞を孵化稚魚から単離し、これを異種宿主へと移植することで、移植した始原生殖細胞を宿主の生殖腺内で機能的な精子へと改変する技法の開発に成功した（図1）（Takeuchi et al., 2004）。このような異種間細胞移植で問題になるのは、宿主による移植細胞の免疫拒絶である。水産上有用種でこのような技術を開発する場合、クローン系統間での移植や、免疫抑制剤の使用は不可能である。そこでこの問題を解決するために、筆者らは免疫系の発生過程に着目した。魚類を含む多くの動物種では、胚形成の後期に免疫に関与する器官の形成が始まる。しかし魚類の場合、孵化時には免疫系の構築が完成しておらず、免疫的に未熟な状態で孵化期を迎えることが知られている（Manning and Nakanishi, 1996）。そこで、この現象を逆手にとって、宿主の免疫系が未熟である孵化前後の稚魚へと異種由来の細胞を移植することを計画した。実際の実験には、始原生殖細胞がGFP遺伝子で蛍光標識されている遺伝子導入ニジマスをドナーに（Yoshizaki et al., 2000; Takeuchi et al., 2002）、通常のヤマメを宿主に用いた。しかし、この孵化前後の稚魚は全長1～1.5cm程度と小さく、これらの宿主個体の腹腔内に存在する未分化生殖腺に、ドナー細胞を直接マイクロインジェクションすることは不可能であった。そこで、筆者らは動物の生殖腺の発生機構を利用することを考えた。

すべての動物はその発生過程において、生殖腺原基は体細胞のみから構成される。この時期に始原生殖細胞は生殖腺外で分化し、その後生殖腺原基から分泌されるケモカインにより誘引されて移動し、最終的に生殖腺原基に取り込まれる。すなわち生殖腺はこの時期になって初めて、体細胞と生殖細胞の両者をもつ構造を完成させるのである（濱口・四ノ宮, 2000; Yoshizaki et al., 2002）。筆者らは、この生殖腺原基から分泌されるケモカインによる始原生殖細胞の誘引を、移植実験に利用しようと考えた（Takeuchi et al., 2003）。実際に、ドナー個体から単離した始原生殖細胞を孵化稚魚の腹腔内に移植すると、移植された始原生殖細胞は宿主生殖腺に向かって仮足を伸長しながら移動し、最終的にはそこにたどり着き、配偶子形成を開始した。さらに、宿主生殖腺内に取り込まれたドナー由来の始原生殖細胞はそこで機能的な精子にまで

分化することを発見した。すなわちニジマス精子を生産するヤマメ親魚の作出に成功した（Takeuchi et al., 2004）。しかし、この実験ではニジマス由来の卵をヤマメに生産させることはできなかった。そもそも1尾のニジマス孵化稚魚が保持する始原生殖細胞数は100にも満たないため、上記の実験を行うには大量のドナー用の稚魚を解剖する必要があるうえ、宿主あたりに移植できる細胞数も実際は10～20細胞と少なかった。そこで、移植細胞数が少ないことが宿主がドナー由来の卵を生産できない理由ではないかと考え、より大量に入手可能な細胞を移植に用いることを検討した。

精原細胞移植

始原生殖細胞は性分化に伴い、雌の卵巣内では卵原細胞へ、雄の精巣内では精原細胞へと分化する。特に雄個体は生涯にわたり極めて多数の精子を生産し続ける。これは精原細胞の中には幹細胞と呼ばれる自己複製能と分化能の両者を兼ね備えた細胞が存在するからと考えられている。筆者らは、この精原細胞、特に幹細胞を移植実験に利用できないかと考えた（Okutsu et al., 2006）。そこで、始原生殖細胞を用いた実験と同様、GFPで蛍光標識を施された精原細胞を性分化後の精巣から調整し、移植実験に供した。始原生殖細胞の実験とは異なり、6ヶ月齢程度の個体1尾から数十万単位の精原細胞が調整可能であるため、この実験では約10000細胞の精原細胞を孵化前後のヤマメ稚魚の腹腔内へと移植した（図2）。その結果、成魚から単離した精原細胞を移植した場合であっても、移植された精原細胞は腹腔内で宿主生殖腺へと向かって移動し、そこに取り込まれコロニーを形成することを見出した。また、移植されたニジマス由来の精原細胞は宿主生殖腺内で宿主ヤマメ自身の精原細胞と同調して増殖、分化し、最終的には機能的な精子にまで分化することを確認した。得られた精液を通常のニジマスから得られた卵に人工授精すると、次世代でニジマス卵とヤマメ精子が受精した雑種に混ざって、完全なニジマスが生まれてきた。これらのニジマスはドナーの遺伝マーカーであるGFP遺伝子を保持していること、さらにはRAPD解析の結果、得られたち魚は完全なニジマスであり、ヤマメゲノムは全く持たないことが確認された。

一方、雌ヤマメ宿主腹腔内へ移植されたニジマス精原細胞も、宿主卵巣内に取り込まれ、そこで増殖、分化を開始した。これらの細胞も宿主ヤマメ自身の卵母細胞と同調して成長し、正常な卵を生産した。得られた卵を通常のニジマス精子と受精した結果、正常なニジマス次世代個体を得ることに成功した。この事実は、成魚の精巣が保持する精原細胞は、精子へと分化することが運命付けられているわけではなく、卵へと分化する能力も併せ持っているということを示している（Okutsu et al., 2006a,b）。また、生殖細胞移植を実用化する際に、孵化前後の稚魚から始原生殖細胞を単離することが不要になり、雄個体が生涯精巣内に持ちつづける精原細胞を用いて卵、精子の両者を生産できるという点は、大きなブレークするになるものと期待される。特に、最初に述べたように絶滅危惧種の保全に本技術を応用する場合、絶滅危惧種の孵化稚魚を大量にサンプリングすることは困難であるため、この点は大きな利点といえる。このように大きな可能性を秘めた精原細胞移植であるが、雌雄どちらの宿主に精原細胞を移植した場合も、宿主個体はヤマメ自身の配偶子と移植細胞由来のニジマス配偶子の両者を生産する。したがって、これらの宿主個体同士を交配した場合、多くの宿主由来のF1に加え、ドナーと宿主の雑種も生じることとなる。この技術を実用化する際はドナー由来の配偶子のみを生産する宿主の作出が重要である。

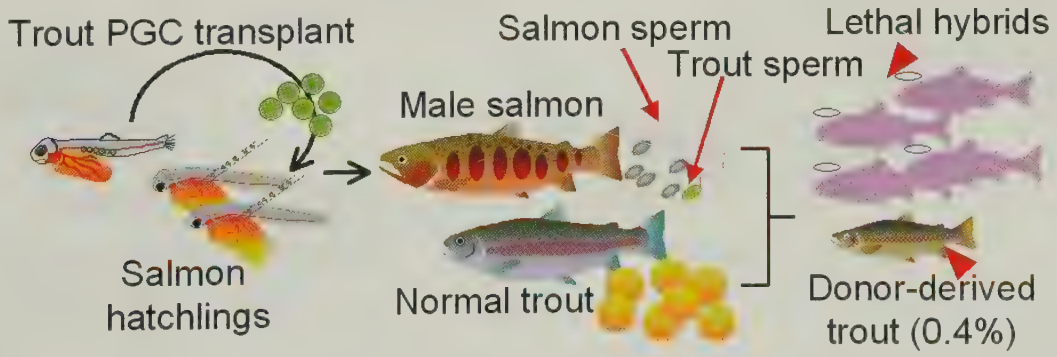


Fig.1. Production of trout-derived sperm from salmon recipient receiving trout primordial germ cells. Normal offspring were obtained by insemination of normal trout eggs with milt obtained from recipient salmon.

Fig.2. Germ cell transplantation into a peritoneal cavity of newly hatched embryo.

異種精原細胞の不妊宿主への移植

ドナー由来の配偶子のみを生産する宿主個体を作出するにあたり重要な点は、宿主自身の配偶子を生産できない個体を移植実験に使用することである。そこで、筆者らは3倍体個体を宿主に利用することを検討した。ヤマメの場合、受精卵を受精から15分後に27℃の温水に15分間浸すだけで、高率で3倍体を作出することが可能である。そこで、得られた3倍体宿主にニジマス精原細胞の移植を行った（Okutsu et al., 2007）。移植後の宿主個体を2～3年間継続飼育した結果、雌雄ともに成熟個体を得ることに成功した。なお、筆者らの飼育条件下では、通常の3倍体個体は雌雄ともに全く成熟は認められなかった。これらの3倍体ヤマメ宿主から得られた卵、精子を人工授精した結果、得られたF1世代のすべての個体が完全なニジマスであった。これらの個体はドナーのマーカーであるGFP遺伝子を保持していたうえ、核ゲノム、ミトコンドリアゲノムの両者が完全にニジマス由来であることも証明された（図3）。

従来、3倍体の不妊の理由は、減数分裂の進行不全といわれてきたが、3倍体個体の生殖腺体細胞が正常な機能を有するか、あるいは3倍体個体の繁殖内分泌系が正常に機能するか、といった点については明瞭な答えが得られていなかった。今回の研究で3倍体の宿主に正常な2倍体の生殖細胞を移植することで機能的な配偶子が得られたことから、3倍体個体の生殖腺体細胞や生殖内分泌系は正常に機能することが明らかとなった。

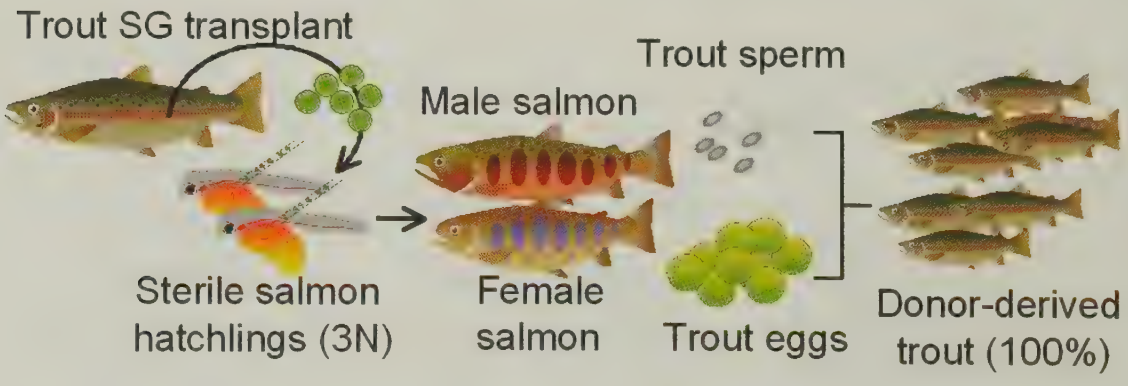


Fig.3. Production of trout offspring from triploid salmon parents receiving trout spermatogonia. Triploid salmon recovered fertility by transplantation of diploid trout spermatogonia and produced either eggs or sperm.

精原細胞の凍結保存

以上のように精原細胞さえあれば、近縁種への移植を介して機能的な卵や精子を生産できることが明らかとなった。たとえば、人為管理下では成熟させ難い種や、雄個体しか採捕できない場合に、当該絶滅危惧種の精原細胞を、飼育が容易で成熟までに要する期間が比較的短い宿主に移植すれば、絶滅危惧種の卵と精子を容易にかつ短期間で得ることが可能になる。しかし、先にも述べたように、この細胞移植技術を生殖細胞の凍結保存技術と組み合わせることで、これらの絶滅危惧魚種の遺伝子資源の保存が極めて現実的になると期待される（Yoshizaki et al., 2003; Okutsu et al, 2006b）（図 4）。上述のように魚類の場合は卵の凍結保存が不可能なため、従来、凍結細胞から個体を作出する技術は皆無であった（卵の凍結保存の成功例は数例報告されているが、他のグループによる追試が全くできていないうえ、最近、これらの凍結方法では解凍後に生きた卵を全く得ることができないという論文まで発表されている）。

そこで、筆者らはニジマスの精原細胞を凍結保存する実験を行った。その結果、細胞を解離した状態で凍結保存を行った場合、プロピレングリコールを含む凍結保存液中で -80℃まで -1℃ / 分で冷却し、その後、液体窒素中に保存するというプロトコールが適当であることが明らかになった（Kanno and Yoshizaki, 未発表データ）。またこの方法で凍結保存した精原細胞を解凍後、上述の方法で移植をすると、凍結後の細胞であっても宿主生殖腺に取り込まれ、そこで機能的な卵や精子にまで分化可能であることを確認した。実際に凍結精原細胞を 3 倍体宿主へと移植することで、凍結細胞由来の卵のみを生産する宿主個体の作出にも成功している。ところが、この方法で絶滅危惧種の精原細胞を凍結するとなると、サンプリング直後の精巣を酵素処理により解離する必要が生じる。この場合、特殊な実験機器が必要なため、実験場所が限定されるということが危惧された。そこで、筆者らは、個体から単離した精巣をそのままの状態で（解離せずに）凍結した場合でも、高生残率で精原細胞を凍結保存できる方法を開発した（Iwasaki & Yoshizaki 未発表データ）。この方法であれば、超低温庫さえあれば、どのような施設においても精原細胞の凍結保存が可能である。凍結した精巣は、ドライシッパーにより施設が整った研究室に輸送後、細胞解離、移植操作を行うことが可能である。

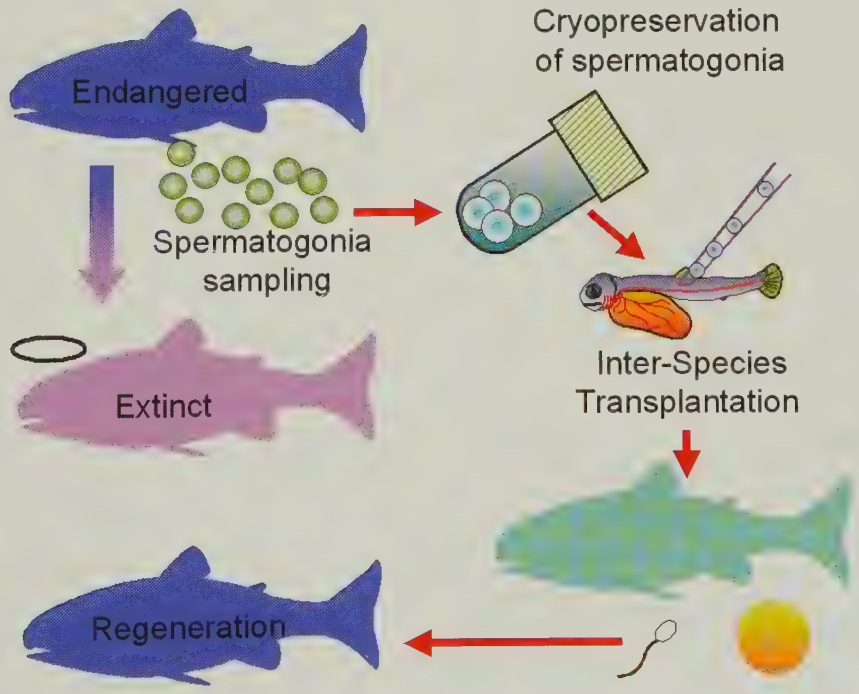


Fig.4. Strategy to regenerate extinct species by cryopreservation of spermatogonia and their transplantation.

絶滅危惧サケ・マス類保護に向けた応用

以上のように、精原細胞凍結、解凍後の細胞の移植、という2つの実験系を融合させることで、再現性よく凍結細胞から機能的な卵を生産することが可能になった。詳細は省略するが、移植技術が構築された現在、もはやGFP遺伝子で蛍光標識した精原細胞を実験に用いることが不要になっており、上述の方法を実際に絶滅危惧種へと適応することが可能になった。凍結細胞からの機能的な卵の生産は世界で初めての例であり、今後この方法が世界各地の希少なサケ・マス類の遺伝子資源の保存に貢献することが期待される。筆者らは既に米国海洋大気局とアイダホ大学との共同で、アイダホ州のRedfish lakeで産卵するベニザケ集団の保全プロジェクトを開始している。このベニザケの産卵場は河口から約1500km、標高2000mの位置にあり、ベニザケは産卵にいたるまでの間、激流に逆らって非常に長い距離を遡上する必要がある。このベニザケ集団は、かつては湖の語源（Redfish）になるほど大量に遡上していたが、近年その遡上個体数が激減し、2006年は3尾、2007年は4尾の遡上しか確認されていない。既にこれらの個体の精原細胞を液体窒素内で保存しており、将来万が一この集団が絶滅した場合には、代理の親魚を用いることで凍結細胞から集団を復活させることが考えられている。種あるいは集団を健全に保全していくためには、個体数がここまで減少してしまう前、すなわち十分な多様性が残されている間に精原細胞を凍結することが重要である。筆者らは、世界各地のサケ・マス類がRedfish lakeのベニザケのようにならないためにも、早いうちに精原細胞のサンプリングを行い、これらを液体窒素内で凍結保存する、いわゆるサケ・マス類の精原細胞バンクを構築したいと考えている。

おわりに

本総説で紹介した技術は、まずサケ・マス類を材料に開発された技術であるが、現在、これを海産魚へ応用しようと検討中である。海産魚の仔稚魚はサケ科魚類と比較すると極端に小型であるため、細胞をマイクロインジェクション法で移植できるかが疑問視されていたが、筆者らの研究グループは既にこの問題を解決し、同様の方法で海産魚の仔稚魚へと精原細胞を移植可能であることを確認している。このような技術が海産魚で構築できれば、クロマグロのように親魚が巨大で飼育に多大な労力、コスト、スペースが必要な魚種の精原細胞を、マサバのような小型宿主に移植することで、クロマグロの配偶子を生産するマサバ宿主の生産も可能になることが期待される

引用文献

Chao N. H., and Liao I. C., 2001: Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. Aquaculture, 197, 161–189.

濱口　哲・四宮　愛, 蛋白質核酸酵素, 45, 2690–2698 (2000)

Kusuda S., 2004: Current status and perspective of cryopreservation of sperm and blastomeres in fish. Fish Genetics and Breeding Science, 34, 1–25.

Manning M. J. and Nakanishi T., 1996: The specific immune system: cellular defences, in “The fish immune system” (ed. by Iwama G and Nakanishi T.), Academic Press, New York, pp.159–205.

Okutsu T., Suzuki K., Takeuchi Y., Takeuchi T., and Yoshizaki G., 2006a Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103, 2725–2729.

Okutsu T., Yano A., Nagasawa K., Shikina S., Kobayashi T., Takeuchi Y., and Yoshizaki G.., 2006b: Manipulation of fish germ cell: Visualization, cryopreservation and transplantation. J. Reprod. Dev., 52, 685–693.

Okutsu T., Shikina S., Kanno M., Takeuchi Y., and Yoshizaki G.., 2007: Production of trout offspring from triploid salmon parents. Science, 317, 1517.

Takeuchi Y., Yoshizaki G., Kobayashi T., and Takeuchi T., 2002: Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the vasa gene promoter. Biol. Reprod., 67, 1087–1092.

Takeuchi Y., Yoshizaki G., and Takeuchi T., 2003: Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. Biol. Reprod., 69, 1142–1149.

Takeuchi Y., Yoshizaki G., and Takeuchi T., 2004: Surrogate broodstock produces salmonids. Nature, 430, 629–630.

若松裕子・尾里健二郎，　2002:　魚類のクローニング. 海洋と生物, 139, 120–125.

Yoshizaki G., Takeuchi Y., Kobayashi T., Ihara S., and Takeuchi T. 2002: Primordial germ cells: The blueprint for a piscine life. Fish Physiol. Biochem., 26, 3–12.

Yoshizaki G., Takeuchi Y., Kobayashi T., and Takeuchi T., 2003: Primordial germ cells: A novel tool for fish bioengineering. Fish Physiol. Biochem., 28, 453–457.

Yoshizaki G., Takeuchi Y., Sakatani S., and Takeuchi T., 2000: Germ-cell specific expression of green fluorescent protein n transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter. Int. J. Dev. Biol., 44, 323–326.

水研センター研報，第24号，107－114，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 107－114, 2008

報　文

魚類の生殖腺性分化機構研究の現状

小林　亨*

The mechanisms of gonadal sex determination and differentiation in fish

Tohru KOBAYASHI

Abstract Various genetic and molecular approaches have been used to investigate the mechanisms of sex determination, gonadal sex differentiation, and sex change in fish. Although the sex of most animals is determined by genetic information, sex-determining genes had been identified only in mammals, several flies, and the worm *Caenorhabditis elegans* until the recent discovery of DMY (DM-domain gene on the Y chromosome) in the sex-determining region on the Y chromosome of the teleost fish medaka, *Oryzias latipes*. We identified, for the first time in non-mammalian vertebrates, DMY, as the sex-determining gene of medaka. In tilapia,, *Oreochromis niloticus*, Foxl2/endogenous estrogens act as the natural inducers of ovarian differentiation, while DMRT1 may be important for testicular differentiation. In the protogynous wrasse, a rapid decline in serum estradiol-17beta levels may be an initial trigger of the female-to-male sex change.

Key words : sex determination, sex differentiation, DMY, DMRT1, estrogen

一般に魚類の性は、性染色体の組み合わせによって遺伝的に性決定される。しかし、哺乳類とは異なり、魚類では孵化直後の稚魚を性ホルモン処理することにより容易に性転換が起こる。また、種によっては水温等の環境条件を変えることで性転換するものもある。しかし、哺乳類と決定的に異なるのは、人為的に作出した性転換魚は、一生を通じて正常に生殖活動を行うことができる。また、サンゴ礁に生息するある種のベラの仲間は、社会環境の変化によって性転換が起こる。通常、一夫多妻で繁殖する形態を示すが、縄張りの雄が死亡あるいは、人為的に除去された場合には、一番大きな雌が雄に性転換する。このような「性的可塑性」を特徴とする魚類は、性決定、生殖腺の性分化機構を解明する上で、極めて有用な生物モデルとなりうる (Nakamura et al., 1998; Devlin and Nagahama, 2002)。

これまで、魚類の性決定や生殖腺の性分化に関する研究の多くは、特に性ホルモンとの関わりで行われてきた。上述したように、孵化直後の稚魚にアンドロゲンやエストロゲンを投与することで、遺伝的な性に関係なく、機能的な雄、雌に性転換させることができる。しかし、内在性の性ホルモンが正常な生殖腺の性分化にも重要な役割を果たしているかは、長い間、不明であった。私たちが性分化の研究を開始した時には、まず、この問題を明らかにする必要があった。

本稿では、メダカ（*Oryzias latipes*）、ナイルティラピア（*Oreochromis niloticus*）、性転換魚を対象とした筆者らの研究を中心として記述し、魚類の性決定、生殖腺の性分化機構研究の現状について概説する。

性決定

脊椎動物の性を決定する遺伝子の構造はどうなっているか、性決定遺伝子は、種を超えた普遍的なものか、非常に興味深い問題である。1990年にヒトの

2008年4月23日受理　(Received on April 23, 2008)
* 養殖研究所　〒519-0423 三重県度会郡玉城町昼田 224-1
(National Research Institute of Aquaculture, Tamaki, Mie519-0423, Japan)
現所属：愛媛大学 南予水産研究センター 松山分室　〒790-8566 愛媛県松山市樽味 3-5-7
(Matsuyama Station, South Ehime Fisheries Research Center, Ehime University, Matsuyama 790-8566, JAPAN)

性決定遺伝子がSRYと同定されて以来(Sinclair et al., 1990)、哺乳類以外の脊椎動物においてSRYの相同遺伝子の存在を確かめる研究が精力的になされたが、これよりにこのような遺伝子は見つかっていない。これに対して、爬虫類でみられるような環境要因（温度）が性決定に深く関わる場合もある。魚類でも孵化後の水温の違いにより性決定される場合がある（ヒラメ：*Paralichthys olivaceus*）(Capel, 2000)。

性決定遺伝子

メダカは、日本で開発された実験動物で、遺伝学的研究を行う上ですぐれた特徴（種内で遺伝的変異が起こる、近交系が樹立、等々）を持ち、ヒトとおなじXX/XYの遺伝的性決定様式を示す（四宮ら, 2003)。筆者の所属していた基礎生物学研究所のグループと新潟大学のグループは共同で、ポジショナルクローニング、染色体歩行、ショットガンシークエンス、機能喪失、機能付加解析により、脊椎動物で２番目となる性決定遺伝子を同定した。この遺伝子によってコードされるタンパク質は、広く脊椎動物と無脊椎動物の性発達にかかわるDNA結合配列（DMドメイン）をもつことから、DMY（DM-related gene on the Y-chromosome）と名づけられた(Matsuda et al., 2002)。

DMYは、mRNA、タンパク質レベルで、孵化前のXY生殖腺（形態学的性差は、まだ見られない時期）の生殖細胞を取り囲む体細胞で強く発現するようになる。DMYは、発生を通じて、セルトリ細胞系列の細胞に特異的に発現する（Kobayashi et al., 2004)。DMYをプローブとして野生集団をスクリーニングしたところ、DMYをゲノム上にもつにも関わらず表現型が雌であるXY個体が見つかった。この中で、福井県芦原町で見つかった変異体は、DMYの第３エクソンに１塩基の挿入があり、これにより不完全なDMYタンパク質が作られていた。交配実験により、このXY雌由来のDMYをもつ個体はすべて雌になった。新潟県白根市（現在は、新潟市白根）でみつかった突然変異体ではエクソン領域に変異はないが、F1におけるこのXY雌由来のDMY発現量が低いこと、そしてこのようなF1は高頻度にXY雌になることがわかった。これらのことは、DMYに変異が起こるとXY個体が雌になること、そしてDMYはXY個体が雄へ分化するのに「必要な遺伝子」であることを示す。

また、HNI系統由来のDMYを含む117 kbのゲノム断片をもつベクターを構築し、d-rR系統の受精卵に遺伝子導入した後、成魚まで飼育し、本来の遺伝子型を判定し、表現型の性と比較すると。41個体のXXメダカの中で、30個体は雌、11個体は雄であった。このXX雄は、d-rR由来のDMYをもたない。また、正常XX雌との交配によるF1においても導入したゲノム断片をもつXX個体は雄になることが明らかとなった。このことは、導入したDMYを含む117 kbのゲノム領域が、XX個体を雄に分化させるのに「十分」な機能をもつと結論され、これによりDMYがメダカの性決定遺伝子であることが、完全に証明された(Matsuda et al., 2007)。

メダカでは、これまでに５つのDMドメイン遺伝子がみつかっており、その中で、DMRT1を含む３つは連鎖群９でクラスターを形成している。DMYのアミノ酸配列はDMRT1と90%を超える高い相同性を示す。また、DMYを含む約260 kbのY染色体に特異的な領域は、連鎖群９のDMRT1およびその周辺領域と相同性がある。これらのことから、メダカの性決定遺伝子DMYの祖先遺伝子は、進化の過程で連鎖群９のDMRT1（DM-related transcriptional factor 1）遺伝子を含む領域の重複化が起こり、それが連鎖群１（現在の性染色体）に挿入されたことによって生じたと考えられている（Nanda et al., 2002)。

メダカの性決定遺伝子DMYはメダカ属以外ではみつかっていない。また、メダカ属でもメダカともっとも近縁なハイナンメダカ（*O.curvinotous*）以外ではみつかっていない。最近の報告から、XX/XYの性決定様式を示すルソンメダカでは、性染色体は連鎖群12であることが明らかとなった。これらのことは、DMYはメダカ属の種分化の過程で生じたこと、性決定遺伝子は種特異的であることを示している(Matsuda et al., 2003; Tanaka et al., 2007)。

生殖腺の性分化

性決定、性分化の研究を行う上で、予め遺伝的な性が分かっていることが望ましいことは自明である。私たちは、ティラピアの偽雄（XX)、超雄（YY）を保持しており、これらを利用して周年、いつでも全雄、全雌のティラピア稚魚を得ることが出来る(Kobayashi et al., 2000)。ティラピアの生殖腺の性分化過程を詳細に調べると、孵化後３日で生殖腺原基の形成がみられる。形態学的雌雄差が現れるのは、孵化後９日頃で生殖細胞数の性差が最初の形態学的性差である。組織構築の性差は、孵化後25日頃にみられる。XX雌では、生殖腺の左右の縁に体細胞の集塊が生じ、それらが互いに伸長した後、融合し、体腔側に小さな腔が形成される。この小腔は、将来、成熟した卵が排卵される卵巣腔となる。この卵巣腔の形成が体細胞レベルでの卵

巣分化の指標となる。卵巣では、減数分裂は孵化後35日頃起こり，40日以降で肥大卵母細胞の発達がみられ、150日以降に卵黄形成がみられる。XY雄では、孵化後25日頃、実質細胞集塊が精巣内輸出管原基へと分化することによって、明瞭になる。その後、精細管構造の形成が起こり、孵化後70日以降に精子形成が開始する (Kobayashi et al., 2000, 2002, 2008; Fig. 1)。

卵巣分化

魚類でエストロゲンが卵巣分化に重要であるとの指摘は古くからされているが、このよりどころは、孵化後の性的に未分化な時期のXY雄の稚魚をエストロゲンで処理すると雌に性転換するという知見である。しかし、内在性のエストロゲンが卵巣分化期に存在するのかは不明であった。私たちは、ティラピアを用いて、卵巣分化に先行してエストロゲンが合成されているのかを調べた。コレステロールからエストロゲン（エストラジオール17 β）やアンドロゲン（11-ケトテストステロン）が合成されるのに必要なステロイド代謝酵素をクローニングし、これらの幾つかについては、特異抗体を作成した。これらをプローブとして、生殖腺性分化過程におけるステロイド代謝酵素の発現を解析した (Kobayashi et al., 2003; Ijiri et al., 2008)。XX雌の生殖腺では，孵化後7日までにステロイド産生細胞が背側血管周辺部に出現し、これらの細胞ではエストロゲンの生合成に必要なステロイド代謝酵素の発現がmRNA、蛋白レベルで検出される。一方、XY雄では、ステロイド産生細胞の分化は認められない。XX雌では、このような時期に芳香化酵素阻害剤によりエストロゲン合成を阻害すると、機能的な精巣をもつ雄に分化する (Nakamura et al., 1999)。このような芳香化酵素阻害剤による遺伝的雌から機能的な雄への性転換は、サケ科魚類を含めて、いくつかの魚種でも知られている。ティラピアでは、上述したように、エストロゲンが初期卵巣分化に不可欠である。XX雌生殖腺で起こる芳香化酵素の発現は雌特異的である。孵化直後のXY雄をエチニルエストラジオールで数日間処理すると機能的な雌へと性転換が誘起できる (Kobayashi et al., 2003)。この時、血管周辺にはエストロゲン合成に必要なステロイド代謝酵素を発現するステロイド産生細胞の出現が認められる（小林ら、未発表)。このことは、外因性のエストロゲンにより、オンとなった内因性のエストロゲン合成系が卵巣への分化を促進することを示唆する。

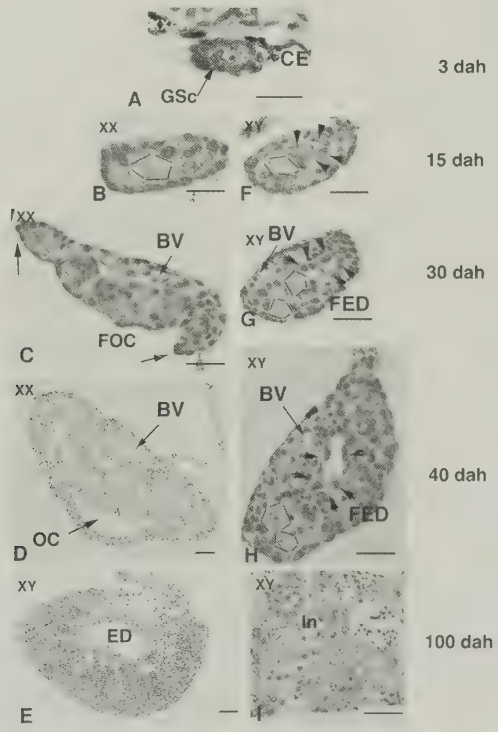


Fig.1. Gonadal differentiation in tilapia. A, gonad at 3 dah. The gonadal anlagen were formed at 3 dah. CE, coelomic epithelium. Gsc, germ-cell-surrounding cell. B-D, XX gonads. E-I, XY gonads. Dotted line, gonial germ cell. BV, blood vessel. FOC, formation of ovarian cavity. FED, formation of efferent duct. Goc, growing oocyte. OC, ovarian cavity. ED, efferent duct. In, interstitium. Scale bars: A-H, 20 μm; I, 30 μm.

遺伝的雌生殖腺で初期に起こる時期、細胞特異的なエストロゲン合成系の発現機構とエストロゲンの作用機構を明らかにすることは重要である。最近、私たちは、遺伝的雌生殖腺で時期、細胞特異的に起こるエストロゲン合成系の発現制御は、転写制御因子であるFoxl2によることを明らかにした(Wang et al., 2007)。Foxl2は、芳香化酵素発現に先行して、XX生殖腺で特異的に発現する。この時、Foxl2、Ad4BP/SF-1、芳香化酵素はステロイド産生細胞で共発現する。In vitroの転写活性化試験から、Foxl2は、Ad4BP/SF-1と協調して芳香化酵素の発現を促進する。また、Foxl2のドミナントネガティブmutantを受精卵に遺伝子導入すると、XX個体では、エストロゲン量の低下、機能的雄への性転換が誘起された。これらのことから、卵巣分化、発達においては、Foxl2/エストロゲンのカスケードが重要な役割を果たしていることが初めて明らかとなった。

一方で、エストロゲンと卵巣分化との関連が明確でない魚としてはメダカがある。メダカでみられる最初の形態学的性差は、ティラピアと同様に生殖細胞の数の性差であるが、孵化直前に既に起こり、卵母細胞への分化は孵化直後にみられる。卵母細胞の出現は、ティラピアと異なり卵巣腔の形成前に起こる。芳香化酵素を含むステロイド代謝酵素の発現は卵巣分化がかなり進行した孵化後数日を経過してからである(Satoh, 1974; Suzuki et al., 2004)。また、メダカの卵巣腔の形成は卵形成が卵母細胞に分化した後に起こり、この形態形成はエストロゲン依存性である(Suzuki et al., 2004)。最近、エストロゲン合成系で必須な17アルファ水酸化酵素／17,20リアーゼ(P450c17)の機能不全を示す突然変異体(scl)では、第二次性徴はみられないのだけれども、XX個体では卵母細胞への分化は起こり、前卵黄蓄積期まで進行する(Sato et al., 2008)。このことは、メダカの卵巣分化の初期過程の進行には、少なくともXX生殖腺での新たなエストロゲンの合成は必要ないことを示唆している。しかし、Foxl2は、孵化期にXX生殖腺に特異的な発現を示し、その後、卵巣でティラピアと同様な発現を示すことが報告されており、Foxl2が初期卵巣分化に関与していることが示唆される(Wang et al., 2004, 2007; Nakamoto et al., 2006)。

精巣分化

XX稚魚にアンドロゲン処理を行うことにより、雄への性転換が誘起できることが、多くの魚種で報告されている(Yamamoto, 1953; Nakamura et al., 1998; Baroiller et al., 1999; Devlin and Nagahama, 2002)。しかし、内在性のアンドロゲンが精巣分化に不可欠であることは実験的に証明されてはいない。ティラピアでは、精巣分化に先行してアンドロゲン生合成に必要なステロイド代謝酵素の発現(mRNA、蛋白)は認められない。また、XY稚魚にアンドロゲン受容体のアンタゴニストであるフルタミド処理を行っても、正常な精巣分化がおこる。

現在のところ、魚類の精巣分化に重要な役割を果たすと考えられる遺伝子は、DMRT1である。この遺伝子は、*Drosophila*のdsx、線虫のmab-3という性決定に重要な役割を果たす遺伝子間で保存されたDNA結合領域(DM-ドメイン)をもつ脊椎動物の遺伝子で、ヒトで精巣に特異的に発現する遺伝子として見つかった(Raymond et al., 1998)。その後、いろいろな脊椎動物でみつかり、ひろく種を超えて共通に存在し、精巣形成、発達に重要な役割を果たすと考えられている(Capel, 2000; Zarkower, 2001)。ティラピアでは、形態学的性差が出現する前の孵化後6日頃のXY生殖腺で生殖細胞を取り囲む上皮細胞(セルトリ細胞の前駆細胞)に特異的に発現するようになる。その後、形態形成の進行にともなってセルトリ細胞、精巣内輸出管上皮といったセルトリ細胞系列の細胞に特異的に発現する。一方、XX生殖腺では、DMRT1の発現はみられない(Kobayashi et al., 2008; Ijiri et al., 2008)。

孵化後にXX稚魚をアンドロゲンであるメチルテストステロンで処理すると、機能的雄へ性転換誘起できる。この時、卵原細胞を取り囲む体細胞(前顆粒膜細胞)でDMRT1の発現が誘起される。また、XY稚魚にエストロゲン処理をし機能的雌への性転換を誘起した時には、生殖原細胞を取り囲む体細胞のDMRT1の発現は抑制される(Kobayashi et al., 2008)。これまでに、DMRT1のXX個体における過剰発現、精巣分化期における機能喪失実験から、DMRT1が精巣分化に重要な役割を果たしていることを裏付ける結果を得ている(未発表)。これらのことから、精巣分化においてDMRT1が重要であることが分かってきた。しかし、DMRT1の時期、細胞特異的発現の制御機構、DMRT1の作用機構に関しては未だ不明な点が多く、今後解明すべき重要な課題である。一方、メダカでは、DMRT1は精巣分化後にセルトリ細胞系列で特異的に発現するようになる(Kobayashi et al., 2004)。しかし、最近、DMRT1の機能不全は、精巣分化の進行に影響する可能性が指摘されている。今後、ティラピアとメダカでDMRT1の機能解明を行うことにより、DMRT1の生殖腺における機能の共通性が見いだせることを期待している(Fig.2)。

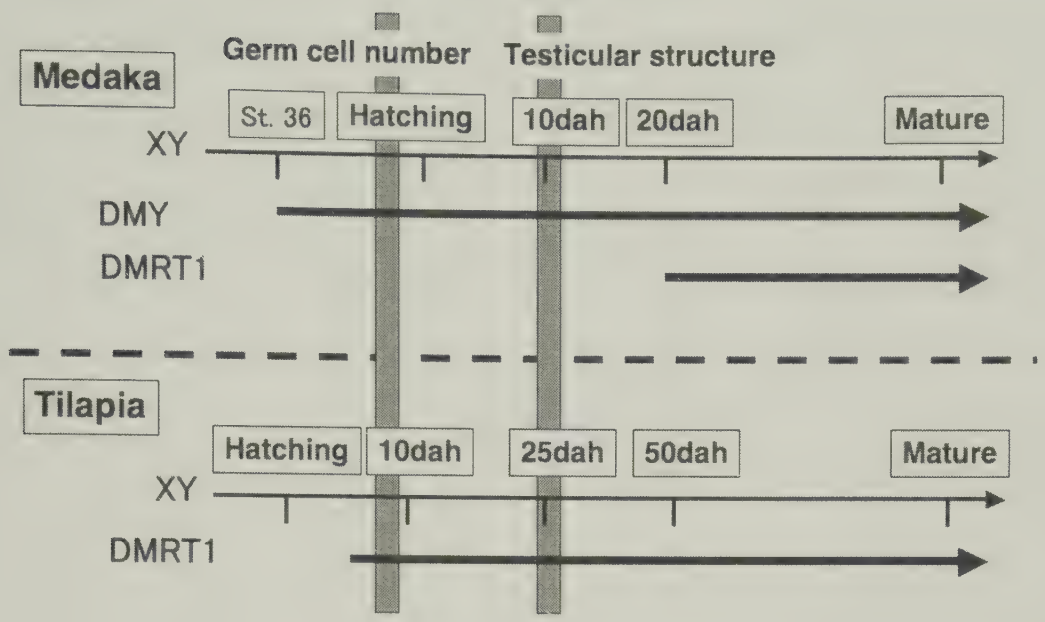


Fig. 2. DMY and DMRT1 expression in medaka and tilapia
Dah, days after hatching. "Germ cell number" and "Testicular structure" indicate the sex difference at the time point.

Sox9 が精巣分化に必要であることが、ほ乳類で知られている（Capel, 2000）。魚類では、ティラピア、メダカでの発現解析から、組織構築レベルの形態学的性差が現れた後に、精巣特異的な発現を示す。このことは、魚類では Sox9 が精巣分化の誘起には関係しないことを示唆する（Nakamoto et al., 2005; Kobayashi et al., 2008）。ほ乳類では、Sox9 は精細管前駆構造である精巣索の形成に関与することが知られている。魚類では、これに相当する構造の形成（ティラピア：精細管原基、メダカ：アキナス構造）は精巣分化後に起こる（Nakamoto et al., 2005; Kobayashi et al., 2008）。このことは精巣分化過程での Sox9 の時期特異的発現は、ほ乳類と魚類で異なるが、魚類でも Sox9 は、ほ乳類と同様に精細管構築に関与していることを示唆している。

性転換

魚類では、社会環境条件の変化により、成熟個体で性転換する種が数多く知られている（Reinboth,1983; Devlin and Nagahama, 2002）。この性転換は、性分化後の成熟個体でみられるため、精巣、卵巣として機能するために必要な因子を解明するのに良いモデルとなりうる。しかし、これまでの研究の多くは、生態学、行動学的な解析であり、細胞、分子レベルでの解析は、立ち遅れている。

雌から雄への性転換

熱帯域のサンゴ礁に生息するベラの仲間でみられる性転換はよく知られている。縄張り雄がいなくなる等の社会性の変化が視覚的刺激として雌の脳に伝わり、一番大きな雌の行動、体色が雄型に変わるとともに、生殖腺が卵巣から精巣へと性転換し、縄張り雄になると考えられている。ハワイ産のベラ（*Thalassoma duperry*）では、性転換過程において、卵母細胞の退行、精原細胞の増殖、精子形成の開始といった一連の過程は、急激に起こり、早いものでは、２週間で完全な精巣へと性転換する（Morrey et al., 1998; Nakamura et al., 2005）。この時、卵巣の顆粒膜細胞で発現している芳香化酵素の発現抑制が最初の変化である。これにより、エストロゲン量が急激に減少する。これと呼応して卵黄蓄積中の卵母細胞が退行し始める。この後、卵胞の退行が進行し、卵巣の大部分を周辺仁期の卵母細胞が占める。この頃、卵巣薄板の基底部に生殖原細胞がみられるようになる。その後、この生殖原細胞は増殖し、シストを形成して精子形成を行う。生殖原細胞が増殖し始めるころに、間質部分に 11 ベータ水酸化酵素（P45011 β）を発現する細胞が増加するとともに、血中のアンドロゲン（11-ケトテストステロン）量が増加する。性転換開始前の雌では、DMRT1 の発現はみられない。性転換開始後、エストロゲン量が減少した生殖腺の卵巣薄板上皮で DMRT1 の発現がみられるようになる。この領域が発達し、精巣部分が形成

される (Nakamura et al., 2005)。また、社会性の変化ではなく、芳香化酵素阻害剤処理によっても同様に性転換することが確かめられている。これらの結果は、この種の性転換は、芳香化酵素の発現抑制によるエストロゲン量の低下が引き金となって起こり、精巣への分化転換には、DMRT1 が重要な役割を果たしていることを強く示唆する。

両方向の性転換

オキナワベニハゼ (*Trimma okinawae*) は、大きな雌と小さな雌を同じ水槽にいれると、約5日で大きな雌が性転換し、雄となる。この雄は、同じ水槽にさらに大きな別の雄を入れると、再び雌に戻る。同じような条件をくりかえすと、何度でも性転換が起こる (Kobayashi et al., 2004; 2005a)。この時、性行動の変化は、性転換の方向に関係なく、30 分以内に起こる。生殖腺の性転換は雌から雄へは、5日、雄から雌へは 10 日で完了する。性転換の方向に関係なく、卵巣の芳香化酵素の発現は大きな変化を示さず、常に高発現を示した (Kobayashi et al., 2004)。卵巣の Ad4BP/SF-1 の発現は、雌機能時に高く、雄機能時には減少する (Kobayashi et al., 2005b)。このことは、社会構造の変化による性転換刺激が、卵巣の Ad4BP/SF-1 の発現を調節し，卵巣の活性化に関与していることを示唆する。しかしながら。精巣ではそのような変化はみられない。また、この種は解剖学的には、雌雄ともに1対の精巣及び卵巣 (計2対の生殖腺) をもつ (Kobayashi et al., 2005a)。これが両方向の機能的性転換を可能にさせるのと同時に、分子レベルの結果の解釈を難しくさせている。最近、雌雄生殖腺内で起こる生殖腺刺激ホルモン受容体遺伝子発現のオン／オフの調節によって生殖腺の機能的性転換を可能にさせていることが明らかとなった (Kobayashi et al., 2008)。今後、雄機能時、雌機能時における両生殖腺の機能変化の詳細を明らかにする必要がある。

おわりに

魚類の性決定と生殖腺の性分化、性転換の分子機構について、私たちの研究成果を中心に概説した。2002 年に脊椎動物で2番目となるメダカの性決定遺伝子：DMY が同定され、2007 年に完全に証明された。このことは、脊椎動物の性決定機構の多様性を分子レベルで初めて実証した。しかし、メダカ属では、DMY をもたない種がほとんどである。これらの性決定遺伝子が何であるのかは、極めて興味深い。メダカと同じ XX/XY システムで性決定されるルソンメダカの研究成果が期待される。また、私たちによる生殖腺の性分化機構について知見が集積されつつあるティラピアの性決定

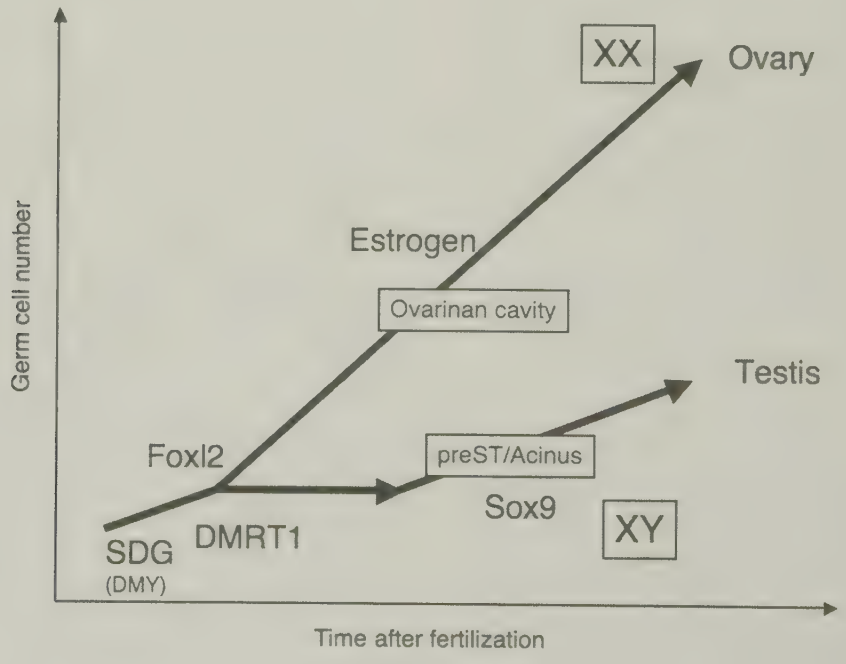


Fig. 3. Gonadal sex determination and differentiation in fish.
Although sex determining gene in medaka is DMY, it is not identified in other fish yet. SDG, sex determining gene. preST, anlagen of seminiferous tubule structure in tilapia. Acinus, acinus structure as anlagen of seminiferous tubule in medaka.

遺伝子が同定されると性決定から性分化にいたるカスケードの理解が一気に早まると期待している。

生殖腺の性分化機構については、ティラピアでの研究から、卵巣分化、発達にはFoxl2/エストロゲンが重要であることが明らかとなった。今後、Foxl2／エストロゲンとDMRT1の発現制御、および作用機構を解明することが性分化機構の実態を理解するには、不可欠であるのは言うまでもない。現在、ティラピアとメダカの性分化期に特異的な発現をする遺伝子について、トランスジェニックによる機能解析に加えて、両魚種において確立した試験管内性分化再現系をツールとして機能解析を行っている。生殖腺の性分化は基本的には形態形成である。この形態形成機構を組織構築の分子解明という観点から明らかにしたいと考えている。

引用文献

Baroiller JF, Guiguen Y, Fostier A.,1999: Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. Cell. Mol. Life Sci. **55**, 910-931

Capel B., 2000: The battle of the sexes. Mech. Develop. **92**, 89-103.

Devlin R. and Nagahama Y., 2002: Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, **208**, 191-366.

Ijiri S., Kaneko H., Kobayashi T., Wang DS., Sakai F., Paul-Prasanth B., Nakamura M. and Nagahama Y., 2008: Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia Oreochromis niloticus. Biol Reprod., in press.

Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y. 2000. Differential expression of vasa homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, Oreochromis niloticus. *Mech. Develop*. **99**, 139-142.

Kobayashi T., Kajiura-Kobayashi H. and Nagahama Y., 2003: Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. *Cytogenet Genome Res*. ,**101**, 289-294.

Kobayashi T., Matsuda M., Kajiura-Kobayashi H., Suzuki A., Saito N., Nakamoto M., Shibata N. and Nagahama Y., 2004: Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes. Dev Dyn*. **231**, 518-526.

Kobayashi T., Kajiura-Kobayashi H., Guan G. and Nagahama Y.,2008:Sexual dimorphic expression of DMRT1 and Sox 9 a during gonadal sex differentiation and hormone-induced sex-reversal in the teleost fish Niletilapia (Oreochromis niloticus). Dev Dyn. **237**, 297-306.

Kobayashi Y., Kobayashi T., Nakamura M., Sunobe T., Morrey CE., Suzuki N. and Nagahama Y., 2004: Characterization of two types of cytochrome P450 aromatase in the serial-sex changing gobiid fish, *Trimma okinawae. Zool. Sci.*, **21**, 417-425.

Kobayashi Y., Sunobe T., Kobayashi T., Nagahama Y. and Nakamura M., 2005a: Gonadal structure of the serial-sex changing gobiid fish *Trimma okinawae. Dev Growth Differ*. **47**, 7-13.

Kobayashi Y., Sunobe T., Kobayashi T., Nakamura M., Suzuki N. and Nagahama Y., 2005b: Molecular cloning and expression of Ad4BP/SF-1 in the serial sex changing gobiid fish, Trimma okinawae. *Biochem Biophys Res Commun*., **332**, 1073-1080.

Kobayashi Y., Nakamura M., Sunobe T., Usami T., Kobayashi T., Manabe H., Paul-Prasanth B., Suzuki N.and Nagahama Y., 2008 : Sex-change in the Gobiid Fish is mediated through Rapid Switching of Gonadotropin Receptors from Ovarian to Testicular protion or Vice-versa. Endocrinology, in press.

Marchand O., Govoroun M., D'Cotta H., McMeel O., Lareyre J-J., Bernot A., Laudet V. and Guiguen Y., 2000: DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss. Biochim. Biophys. Acta* **1493**, 180-187.

Matsuda M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey CE., Shibata N., Asakawa S., Shimizu N., Hori H., Hamaguchi S. and Sakaizumi M., 2002: DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, **417**, 559-563.

Matsuda M., Sato T., Toyazaki Y., Nagahama Y., Hamaguchi S. and Sakaizumi M., 2003: Oryzias curvinotus has DMY, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes. Zool. Sci* **20**, 159-161.

Matsuda M., Shinomiya A., Kinoshita M., Suzuki A., Kobayashi T., Paul-Prasanth B., Lau EL., Hamaguchi S., Sakaizumi M. and Nagahama Y., 2007: DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc Natl Acad Sci U S A.*,

104, 3865-3870.

Morrey, C.E., Nakamura M., Kobayashi T., Grau, E.G. and Nagahama, Y., 1998: P450scc-like immunoreactivity throughout gonadal restructuring in the protogynous hermaphrodite *Thalassoma duperrey*. *Intl. J. Dev. Biol.* **42**, 811-816.

Nakamoto M., Matsuda M., Wang DS., Nagahama Y. and Shibata N., 2006: Molecular cloning and analysis of gonadal expression of Foxl2 in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun*. **344**, 353-361.

Nakamoto M., Suzuki A., Matsuda M., Nagahama Y. and Shibata N., 2005: Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun*. **333**, 729-736.

Nakamura M., Kobayashi T., Chang X-T. and Nagahama Y., 1998: Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.* **281**, 362-372.

Nakamura M., Kobayashi T., Yoshiura Y. and Nagahama Y., 1999: Role of endogenous steroid hormones on gonadal sex differentiation in fish. In: Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. eds. by Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E. and Stefansson, S.O. Bergen, pp.247-249.

Nakamura M., Kobayashi, Y., Miura S., Alam, M.,A. and Bhandari R. K., 2005: Sex change in coral reef fish. *Fish Physiol Biochem*., **31**, 117-122

Raymond CS., Shamu CE., Shen MM., Seifert KJ., Hirsch B., Hodgkin J. and Zarkower D., 1998: Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*. **91**, 691-695.

Reinboth R. 1983: The peculiarities of gonad transformation in teleosts. In: Mechanisms of gonadal differentiation in vertebrates. Müller U, Franke WW (eds). Springer-Verlag, Berlin, pp. 82-86.

Sato T., Suzuki A., Shibata N., Sakaizumi M. and Hamaguchi S., 2008: scl, a novel mutant of the medaka fish, *Oryzias latipes*, with no secondary sex characters. *Zool. Sci*., **25**, 299-306.

Satoh N., 1974: An ultrastructural study of sex differentiation in the teleost *Oryzias latipes*. *J Embryol Exp Morphol*. **32**, 195-215.

Sinclair AH., berta P., Palmer MS., Hawkins JR., Griffiths BL., Smith MJ., Foster JW., Frischauf AM., Lovell-Badge R. and Goodfellow PN. 1990: A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, **346**, 240-244.

四宮 愛、濱口 哲、酒泉 満、2003：メダカの性決定遺伝子と生殖巣の性分化：脊椎動物の新しい性決定遺伝子 *DMY*. *細胞工学*, **22**, 1090-1096.

Suzuki A., Tanaka M., Shibata N. and Nagahama Y., 2004: Expression of aromatase mRNA and effects of aromatase inhibitor during ovarian development in the medaka, *Oryzias latipes*. *J Exp Zoolog A Comp Exp Biol*., **301**, 266-273.

Tanaka K., Takehana Y., Naruse K., Hamaguchi S. and Sakaizumi M., 2007: Evidence for different origins of sex chromosomes in closely related Oryzias fishes: Substitution of the master sex-determining gene. *Genetics*, **177**, 2075-02081.

Wang DS., Kobayashi T., Zou, L-Y. and Nagahama Y., 2004: Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., **320**, 83-89.

Wang DS., Kobayashi T., Zhou LY., Paul-Prasanth B., Ijiri S., Sakai,F., Okubo K., Morohashi K.I. and Nagahama,Y., 2007: Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription female-specifically by binding to the promoter as well as interacting with Ad4BP/SF-1. *Mol. Endocrinol*., **21**, 712-725.

Yamamoto T., 1953: Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). *J Exp Zool*., **123**, 571-594.

Zarkower D., 2001: Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat Rev Genet*., **2**, 175-185.

水研センター研報，第24号，115－122，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 115－122, 2008

報　文

性ステロイドホルモンによる精子形成および初期卵形成の制御機構

三浦　猛*

Control mechanisms of fish spermatogenesis and early oogenesis by steroid hormones

Takeshi MIURA

Abstract Fish spermatogenesis is controlled by the sex steroid hormones. Mitotic divisions of spermatogonia can categorized by spermatogonial stem cell renewal and spermaogonial proliferation toward meiosis. Spermatogonial renewal is regulated by estradiol-17 β (E2) and spermatogonial proliferation toward meiosis is promoted by 11-ketotestosterone (11-KT). The action of E2 and 11-KT is mediated by other factors produced by Sertoli cells; E2 is mediated by spermatogonial stem-cell renewal factor and 11-KT is mediated by spermatogenesis preventing substance (anti-Müllerian hormone: AMH) and activin B. Meiosis is induced by 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP), which is progestin in teleost. In oogenesis, DHP also initiate meiotic prophase. After spermiogenesis, immature spermatozoa undergo sperm maturation. Sperm maturation is also regulated by DHP. The DHP acts directly on spermatozoa to active the carbonic anhydrase existed in the spermatozoa. This enzymatic activation causes an increase in the seminal plasma pH, enabling spermatozoa to motile.

精子形成および卵形成は、生殖腺刺激ホルモンをはじめとする様々な内分泌因子および成長因子によって複雑に制御されている。とくに雄性ホルモン、雌性ホルモンおよび黄体ホルモンといった性ステロイドホルモンは、配偶子形成の制御に対し、中心的な役割をなしている。私たちはこれまで、ニホンウナギ（*Anguilla japonica*）を中心とした精巣や卵巣の各種培養系を用いてこの制御機構の解析を行ってきた。ここでは、1998年度から2007年度まで行われたバイオデザイン計画の中で得られた成果を中心に、主として精子形成の制御機構、および精子形成の初期過程とよく似た制御機構である卵原細胞の増殖から減数分裂開始までの卵形成の初期過程をステロイドホルモンの役割を中心に解説する。

配偶子形成制御機構解析系

精子形成および卵形成の初期過程の制御機構を解明するためには、解析に適した実験系の存在が重要である。ウナギは、淡水での飼育条件化では精巣中に精子形成開始前の精原幹細胞のみが存在すること、ヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン（hCG）の投与により人為的に精子形成の全過程を誘導することが可能なこと（Miura et al., 1991a）、精巣器官培養（Miura et al., 1991b）および精原細胞と精巣体細胞の共存細胞培養系（Miura et al., 1996）により、生体外で精子形成の全過程を再現することが可能なことより、精子形成の制御機構に適した動物ということができる。卵形成の過程は、卵原細胞の増殖から減数分裂開始の過程の期間が精子形成の場合と比較して非常に短く、また卵黄形成の過程が存在するため、解析するのが困難であると考えられてきた。しかし近年、サケ科魚類のイトウ（*Hucho perryi*）およびコイ（*Cyprinus carpio*）等の卵巣器官培養系が開発され（Miura et al., 2007）、卵原細胞の増殖から減数分裂開始の過程に関しては解析することが可能となった。私たちはこれらの実験系を用いて、精子形成および卵形成初期過程の制御機構を解析してきた。

2008年4月23日受理　(Received on April 23, 2008)
* 〒798-4292 愛媛県南宇和郡愛南町船越1289-1 (South Ehime Fisheries Research Center, Ehime University, Funakoshi, Ainan, Ehime)

精原細胞の増殖

精子形成は、精原幹細胞（A型および初期B型精原細胞）の再生分裂、減数分裂に向けた増殖型精原細胞（後期B型精原細胞）の体細胞分裂による増殖分裂、2回の分裂を伴う減数分裂、著しい形態変化を伴う精子変態、精子が運動能・受精能を獲得する精子変態の各過程から構成される。これらは、非常に複雑な、しかも巧妙な機構によって制御されている

精原細胞は体細胞分裂によって、その数を増やす。この体細胞分裂は、緩やかなスピードで進行し、個体の精子数を既定する精原幹細胞から精原幹細胞への再生分裂と、急激で不可逆的な減数分裂に向けた増殖分裂の2種類が存在する。これらの過程はステロイドホルモンによる異なる制御機構によって制御されている。

1）精原幹細胞の再生分裂

雌性ホルモンは、これまでメスのホルモンであり、オスでの作用はあまり考慮されてこなかった。しかし、精原幹細胞の再生分裂は、雌性ホルモンであるエストラジオール 17β（E2）によって制御されていることが明らかとなった（Miura et al., 1999, Amer et al., 2001）。魚類の血中には、メスのみならずオスにも、精子形成の何れの時期にもE2が低いレベル（50pg/mlから1ng/ml程度）ながら存在する。また、E2のレセプターである雌性ホルモンレセプター（ER）も、精原細胞を取り囲むセルトリ細胞を中心に発現している。このようにE2は、オスの血中に存在し、そのレセプターがセルトリ細胞に存在することから、精子形成の何らかの過程に作用することが考えられた。E2をサイラスティックチューブを用いてウナギに投与したところ、精原幹細胞のDNA合成が誘導され、また、E2の競争阻害剤であるタモキシフェンを投与したところ、精原細胞のDNA合成が有意に減少した。E2投与によって体細胞分裂が誘導された精原細胞は、いわゆる増殖型の精原細胞（後期B型精原細胞）の体細胞へ分化しなかったことより、この精原細胞の体細胞分裂は、精原幹細胞から精原幹細胞への再生分裂過程であるものと考えられた。このE2による精原幹細胞の再生分裂はウナギおよびサケ科魚類のイトウの精巣器官培養に10pg/mlの低濃度を添加した場合でも再現されたことから、E2は精巣に直接作用し、精原幹細胞の再生分裂を誘導していることが明らかとなった。

一般に、ステロイドホルモンは、その核内受容体を介して、標的遺伝子の発現を誘導し作用するものと考えられている。そこで、ウナギの各種精巣培養系を用いて雌性ホルモンの精子形成への作用機構を分子レベルで解析した（Miura et al., 2003）。ウナギの精巣器官培養系を用いてE2の刺激によって精巣で発現するcDNAのクローニングを行った。その結果、精子形成関連因子34（eSRS34）のクローニングに成功した。この因子は、その予想されるアミノ酸配列から、ヒトのPD-ECGFと相同であることが明らかとなった。ウナギPD-ECGF（ePD-ECGF）は、後に解説する精子形成誘起ステロイド：11 ケトテストステロン（11 KT）の刺激では精巣で発現せず、E2の刺激によってのみ精巣で発現した。ePD-ECGFの組み換え体タンパクをバキュロウイルスの発現系で作製し、精原細胞とセルトリ細胞の共存培養系に添加したところ、組み換え体ePD-ECGFは精原幹細胞の再生分裂を誘導した。また、作製した抗ePD-ECGFは、E2によって誘導される精原幹細胞の再生分裂を有意に抑制した。以上の結果より、ePD-ECGFはE2の下流で精原細胞の再生分裂を制御する「精原幹細胞再生分裂因子」であることが明らかとなった。フィブリノーゲン（FgBおよびFgG）は、傷口や癌での細胞増殖の制御していることが知られている（Staton et al., 2003）。マダイでは、これらFgBおよびFgGがE2の刺激により精巣での発現が誘導する（Pinto et al., 2006）。これらの因子は、ePD-ECGFと同様精原幹細胞の再生分裂を誘導する因子の一つであるのかもしれない。

2）精原細胞の減数分裂に向けた増殖分裂の制御

脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモンの刺激により、精原幹細胞の再生分裂は、減数分裂へ向かう精原細胞の不可逆的な増殖分裂へと移行する。一般的には、この時点を精子形成の開始点、すなわち春期発動とする。魚類の下垂体には、他の脊椎動物と同様、濾胞刺激ホルモン（FSH）と黄体ホルモン（LH）の2種類の生殖腺刺激ホルモンが存在する。この2種類の生殖腺刺激ホルモンは、魚類では生殖周期を通して、異なる産生分泌パターンを示す。具体的には、FSHは春期発動に伴い、その血中量が増加し、LHの血中量は産卵期直前に著しく増加する（Part et al,, 1996, Shimizu et al., 2003, Swanson et al., 1989, Gomez et al., 1999）。このことは、FSHは主として精子形成の初期過程に、LHは主として成熟後期課程に作用する可能性が高いことを示している。最近私たちは、ウナギの精巣器官培養系を用いて、FSHが精子形成開始の引き金を引く鍵となる生殖腺刺激ホルモンであることを示すことに成功した（Ohta et al., 2007）.

ウナギのFSH受容体（FSH-R）cDNAをクローニングし、これを基にして作製した組み換え体タンパクを

抗原にFSH-R特異抗体を作製し、これを用いて精巣でのFSH-Rの発現を調べた。その結果、FSH-Rの発現部位は、ステロイド産生細胞であるライディッヒ細胞と精原幹細胞を取り囲むセルトリ細胞で発現していることが明らかとなった。

バキュロウイルスの発現系で作製された組み換え体ウナギFSH（r-eFSH）をウナギの精巣の器官培養に添加して培養したところ、精原細胞の増殖から精子変態にいたる一連の精子形成過程が誘導された。このr-eFSHによって誘導された精子形成は、Δ5ステロイドから活性型のΔ4ステロイドへの転換に関与するステロイド転換酵素：3β－水酸基脱水素酵素（3β-HSD）の活性阻害剤であるトリロスタンによって抑えられた。r-eFSHは、主として雄性ホルモン：11-ケトテストステロン（11-KT）の精巣での産生を直接誘導すること（Kamei et al., 2006, Ohta et al., 2007）、以前に報告しているように11-KTは、精子形成誘起ステロイドであることから（Miura et al. 1991）から、FSHの精子形成への主要な作用は、11-KTの産生であり、この産生された11-KTが、精子形成を誘導しているものと考えられた。しかしながら、FSH-Rが未熟な精原細胞を取り囲むセルトリ細胞で発現していることから、11-KTの産生誘導以外にも何らかの作用があるものと考えられる。

11-KTは、Idler（1961）らによって、オスのベニザケ（*Oncorhynchus nerka*）で、主要な雄性ホルモンとして同定されたステロイドである。多くの魚種では、このステロイドは生殖腺刺激ホルモンの刺激により精巣で産生され、精子形成の進行中、血中に高濃度認められることが知られている（Billard et al., 1982）.

11-KTの精子形成への機能は、ウナギの精巣器官培養で行われた私たちの研究により、既に明らかになっている（Miura et al., 1991）。この研究では、11-KTをL-15を基本とした血清を含まない培養液に添加し、精原幹細胞のみを持つウナギの精巣をすると、精子形成が惹起され、精原細胞の増殖から精子変態にいたる一連の精子形成過程を誘導することから、11-KTがウナギの精子形成誘導因子であることが証明された。キンギョ（Kobayashi et al. 1991）およびイトウ（Amer et al., 2001）でも11-KTが精子形成を誘導することから、11-KTは、魚類共通の精子形成誘起ホルモンである可能性が高い。

11-KTの精子形成誘導のメカニズムは、どのようなものであろうか？ 11-KTの受容体が、セルトリ細胞に発現していることから（Ikeuchi et al., 2001）、11-KTの精子形成への作用はセルトリ細胞での何らかの物質産生を介しているものと考えられる。そこで、hCG投与によるウナギの精子形成誘起時に、血液中での11-KT量が著しく増加するが、この時期に精巣での発現が変化するcDNAのクローニングを遺伝子発現差解析により行った。この解析により35種類の精子形成の進行でユニークな発現変化を示すcDNAクローンを得ることに成功した（Miura and Miura 2001）。得られたcDNAクローンの中で、最も重要な作用を示したのが、アクチビンBと抗ミュラー氏管ホルモン（AMH）であった。

アクチビンBは2つのアクチビンβ-BサブユニットからなるTGF βスーパーファミリーに属する二量体の成長因子である。アクチビンBのウナギ精巣での発現を調べたところ、精子形成開始の引き金が引かれた直後の精巣で発現が認められ、その発現部位は生殖細胞の支持細胞であるセルトリ細胞であった。また、精巣器官培養の解析では、11-KTの刺激によりその転写および翻訳が著しく誘導された。チャイニーズハムスター卵巣由来のCHO細胞の発現系を利用して組み換え体タンパクを作製し、精巣器官培養を用いてアクチビンBの精子形成に対する直接的な作用を解析したところ、アクチビンBは精原細胞の増殖を誘導した。しかし、アクチビンBは減数分裂以降の過程を誘導することはできなかった。このことよりアクチビンBは、精原細胞の増殖を誘導する因子であるものと考えられた（Miura et al., 1995a, b）。

AMHもアクチビンと同様TGF-βスーパーファミリーに属している因子である。AMHは、その名前が示すように、ほ乳類では、ミュラー氏管の発生を抑え、オスの性分化に重要な役割を果たす因子である（Balanchard and Josso, 1974）。

ウナギでは、AMHは未熟な精巣で発現しており、hCG投与による精子形成開始時に消失する因子としてクローニングされた。AMHは、未熟精巣のセルトリ細胞で発現しており、このmRNAの発現は、hCGのみならず11-KTの刺激によっても消失する。CHOの発現系により組み換え体ウナギAMH（r-eAMH）を作製し、ウナギ精巣の各種培養系を用いてAMHの精子形成に対する機能を調べた。その結果、r-eAMHは、11-KTによって誘導される精原細胞の増殖分裂を抑制した。また、抗-eAMH抗体を培養液に添加して精原幹細胞とセルトリ細胞の共存培養を行ったところ、抗-eAMH抗体は、精原細胞の増殖分裂を誘導した。これらの結果より、AMHは、精子形成抑制因子として、精子形成の開始を抑える働きがあることが明らかとなった。ウナギ以外の魚でもAMHは、精子形成の進行とともにその発現が減少することが報告されており、魚全般を通して、AMHは、精子形成の進行を抑

ていると考えられる。

最近、メダカを用いた研究により、AMHは生殖隆起に到達した始原生殖細胞の増殖を誘導すること(Shiraishi, 2008)、また性分化期のオスの生殖細胞の増殖を抑える作用（Morinaga et al., 2007)があることが報告されており、ここで解説した精子形成への作用も含めて、AMHは魚類の生殖の諸現象に対して、多機能な因子であるものと考えられる。

減数分裂の開始機構

増殖型の精原細胞（後期B型精原細胞）は、FSHおよび11-KTの刺激によって開始される増殖分裂の後、減数分裂へと移行し、精母細胞となる。魚類の主要な黄体ホルモン:17 α,20 β－ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン（DHP）は、この精原細胞の減数分裂開始にとって無くてはならない因子であることが最近明らかになった（Miura et al., 2006)。

黄体ホルモンは、妊娠の準備や、妊娠期間中の胚への栄養供給など、哺乳類のメスの生殖にとって重要な因子である。また、魚類を含め脊椎動物全般で、黄体ホルモンは卵成熟を誘起する。このメスの性成熟に関わるホルモンが、オスの成熟にも作用する。

サケ科魚類では、成熟に伴う血中のDHP量の変化を調べると、産卵期での大きなピークと、精原細胞の増殖期での小さなピークの2つが認められる。このうち産卵期のDHPの大きなピークは精子の成熟に関与するが、これに関する詳細は後述する。一方、精原細胞増殖期のDHPの小さなピークは、1985年以来知られているが（Baynes and Scott, 1985)、その役割は明らかとなっていなかった。私たちの研究グループは、このDHPのピークの意味をウナギの実験系を用いて解析した。

ウナギではDHPおよびそのレセプターが、精子形成の初期過程の精巣で存在することから、精子形成の制御にDHPが関与する可能性が高い。そこで精巣器官培養系にDHPを添加して培養したところ、DHPは精原細胞のDNA合成を誘導した。先に述べたように11-KTは、精子形成開始の引き金を引くホルモンであり、精巣の培養系へこのホルモンを添加しても、精原細胞のDNA合成は誘導される。11-KTとDHPの関係を調べるために、精巣中での精子形成に伴う11-KTとDHPの挙動を調べたところ、精子形成開始とともにまず、11-KTが精巣で産生され、続いてDHPが産生されることが明らかとなった。さらに11-KTを添加して精巣を生体外で培養すると、精巣はDHPを産生することから、11-KTがDHPの産生を誘導していることが明らかとなった。11-KTによるDHPの産生のメカニズムの詳細は明らかではないが、11-KTがP450c17などの精巣でのステロイド転換酵素の発現量を変化させることから、11-KTはステロイド合成経路に作用する酵素の発現を調節して、DHPの産生を制御しているものと考えられた。次に、抗DHP抗体を精原細胞とセルトリ細胞の共存培養系に添加してDHPの作用を阻害し、11-KTにより誘導される精子形成にどのような影響を与えるかを調べたところ、抗DHP抗体は、11-KTによって誘導される精原細胞の増殖は抑制しないが、減数分裂開始時の生殖細胞のDNA合成を抑えることが明らかとなった。さらに精巣培養系へのDHP処理は、精原細胞に対し、減数分裂前期での相同染色体の組み換えに作用するDmcIやSpo11の発現や、本来減数分裂を起こさない精原幹細胞に対して減数分裂前期に出現するシナプトネマ構造を出現させることから、DHPは減数分裂の減数分裂の開始の引き金を引く因子であることが明らかとなった。

最近DHPが、精子形成のみならず卵形成に関しても、減数第一分裂の開始を誘導することが、イトウ（*Hucho perryi*）およびコイ（*Cyprinus carpio*）の卵巣器官培養を用いた実験によって示された（Miura et al., 2007)。イトウの卵原細胞を多く含む卵巣器官培養系およびコイの卵母細胞を取り除いた卵原細胞のみを含む卵巣培養系にDHPまたはE2を添加して培養したところ、E2を添加して培養した卵巣片中の卵原細胞は体細胞分裂によるDNA合成が盛んに行われたのに対し、DHPを添加して培養した卵巣片中の生殖細胞は、DNA合成が盛んになるとともに、減数分裂前期のマーカーとなるSpo11の発現やシナプトネマ構造が出現した。この結果は、初期の卵形成ではE2が卵原細胞の増殖を誘導し、DHPが精子形成の場合と同様に、減数第一分裂の開始を誘導することを示している。

以上に示すように、黄体ホルモンDHPは、精子形成および卵形成の何れに関しても減数第一分裂の開始の制御に無くてはならない因子であることが明らかとなった

DHP以降の減数分裂の開始制御機構に関しては、現在DHPによって精巣での発現が変化する遺伝子のクローニング等を行っており（Ozaki et al., 2006)、今後解析が進んでいくものと思われる。

オスの最終成熟の制御

魚類の産卵期には、雌雄とも、様々な生殖現象が引き起こされる。メスでは卵成熟・排卵および卵巣腔液の産生、および産卵、オスでは、輸精管に排出される

精子量の増加、吸水を伴う精液量の著しい増加、精液の性状の変化とそれに伴う精子の運動能の獲得および放精などがそれである。これらの現象の制御には、様々な内分泌因子が関わる。ここでは、これらのうち、特に私たちが解析してきた精子の運動能の獲得の内分泌制御機構を解説する。

産卵期のオスでは、下垂体からのLHの産生分泌と、LHの刺激により精巣で産生される11-KTとDHPの著しい血中量の増加が認められる。この産卵期の内分泌のイベントと、吸水を伴う精液量の増加が一致することから、LHをはじめとする内分泌因子が精液量の増加に関係するものと考えられるが、その詳細のメカニズムは明らかとなっていない。

産卵期に起こる様々な現象のうち、精液量の増加とともに重要なのは、精子の運動能の獲得である。サケマスをはじめとする数種の魚類では、変態した直後の精子は、運動能をもっておらず、精子成熟の過程を経て、精子が運動能を獲得することがあきらかとなっている。この精子成熟の過程は、輸精管内の精液の水成分である精漿の重炭酸イオンの増加に伴うpH値の上昇に起因する。一般に魚類の体液のpHは7前後と中性であるが、成熟した魚類の精漿のpHは、8から9のアルカリ性である。このpH値の上昇が未成熟精子に働きかけ、精子内のcAMPを増加させ、精子に運動能を与えるものと考えられる（Morisawa and Morisawa 1988; Miura et al., 1992, 1995; Ohta et al., 1997）。

この精子成熟は内分泌の制御を受けており、サケ科魚およびウナギではDHPがこの過程の制御に関わっているものと考えられる（Miura et al., 1991 d, e, 1992）。DHPを最終的に産生する細胞は精子であるが（Ueda et al., 1985）、この精子で作られたDHPが精漿のpHを上昇させ、精子に運動能を与えるものと考えられる（Miura et al., 1991d, 1992, 1995c）。

まとめ

図に、これまで解説した精子形成と初期卵形成過程の制御機構を示す。この図が示すように、精原細胞の再生分裂から精子変態・精子成熟にいたる精子形成過程と卵原細胞の増殖から減数分裂開始までの初期卵形成過程は、性ステロイドホルモンを中心とした様々な内分泌因子、およびこれらの内分泌因子によって制御を受ける様々なタンパク性の成長因子によって複雑に制御されている。バイオデザイン計画で得られた成果のうち、特筆すべき点は、精子形成の初期過程と卵形成の初期過程の各制御機構は、共通点が非常に多いことが明らかになったことである。卵形成では、いわゆる11-KTによる急激な原細胞の増殖過程は無いが、E2による再生分裂過程、DHPによる減数分裂の開始などは、精子形成および卵形成でほぼ同様である。このように雌雄配偶子形成での似ている点、異なる点を比較しながらさらに解析を進めることにより、難種苗生産魚の人為催熟を行うにあたっての、精子形成および卵形成でのそれぞれの問題点の解決の一助になるのではないかと考える。

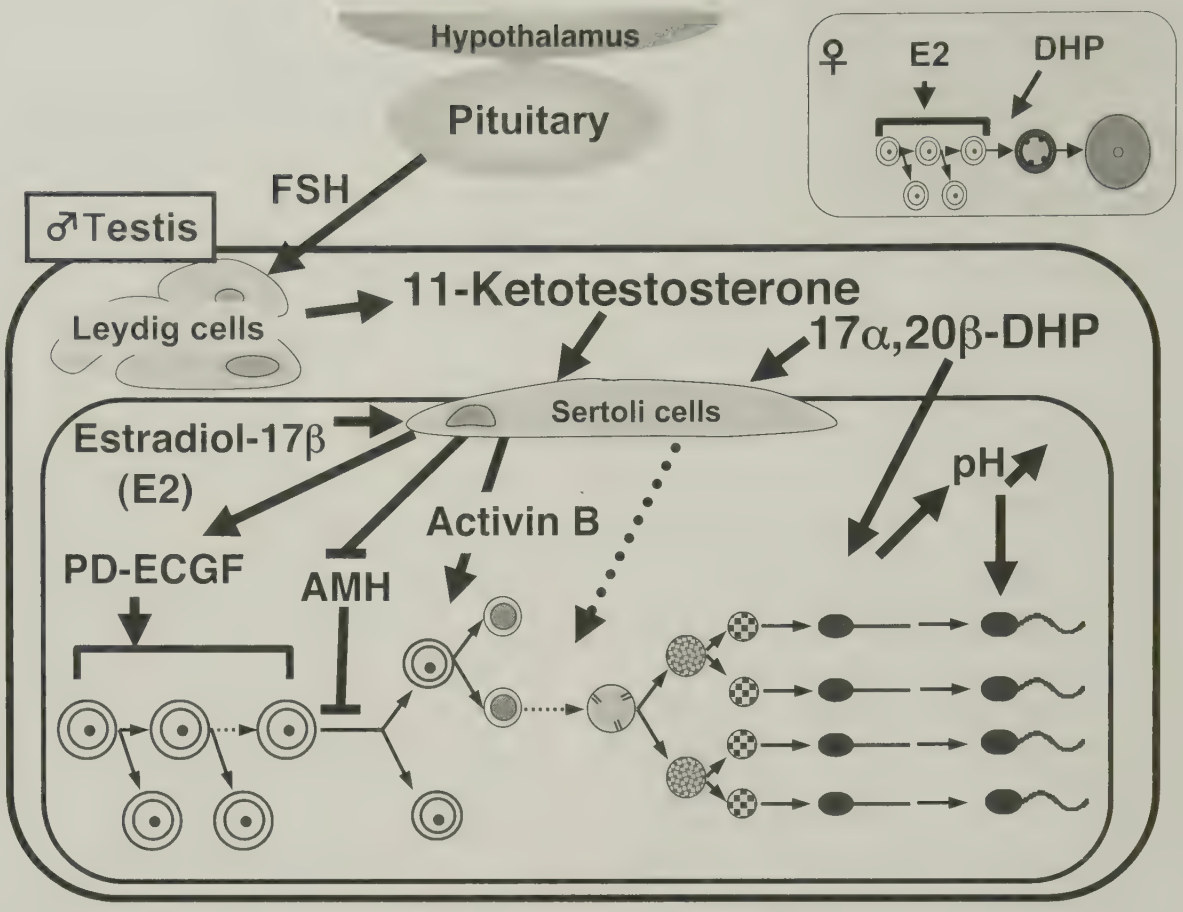


Fig. A schmatic summarizing the possible control mechanisms of fish spermatogenesis and early oogenesis by steroid hormones.

文 献

Amer, M.A., Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K., 2001. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). Biol. Reprod. 65, 1057-1066.

Baynes, S.M., Scott, A.P., 1985. Seasonal variations in parameters of milt production and in plasma concentration of sex steroids of male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Gen. Comp. Endocrinol. 57, 150-160.

Billard, R., Fostier, A., Weil, C., Breton, B., 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. Can. J. Fish. Aquat. 39, 65-79.

Blanchard, M., Josso, N., 1974. Source of anti-Müllerian hormone synthesized by the fetal testis: Müllerian inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in culture. Pediatr. Res. 8, 968-971.

Gomez, J.M., Weil, C., Ollitrault, M., Le Bail, P.Y., Breton, B., Le Gac, F., 1999. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen. Comp. Endocrinol. 113, 413-428.

Idler, D.R., Bitners, I.I., Schmidt, P.J., 1961. 11-Ketotestosterone: an androgen for sockeye salmon. Can. J. Biochem. Physiol. 39, 1737-1742.

Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T., Nagahama, Y., 2001. Two subtypes of androgen and progestogen receptors in fish testes. Comp. Biochem. Physiol. 129B, 449-455.

Kobayashi, M., Aida, K., Stacey, N.E., 1991. Induction of testis development by implantation of 11-ketotestosterone in female goldfish. Zool. Sci. 8, 389-393.

Miura, C., Higashino, T., Miura, T., 2007. A progestin and an estrogen regulate early stages of oogenesis in fish. Biol. Reprod. 77, 822-828.

Miura, C., Higashino, T., T., M., 2007. A progestin and estrogen regulate early stages of oogenesis in fish. Biol. Reprod. 77, 822-828.

Miura, C., Miura, T., Yamashita, M., Yamauchi, K., Nagahama, Y., 1996. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in germ-somatic cell coculture from immature Japanese eel testis. Dev. Growth Deffer. 38, 257-262.

Miura, T., Miura, C., 2001. Japanese eel: a model for analysis of spermatogenesis. Zool. Sci. 18, 1055-1063.

Miura, T., Yamauchi, K., Nagahama, Y., Takahashi, H., 1991a. Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. Zool. Sci. 8, 63-73.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991b. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5774-5778.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991c. Involvement of steroid hormones in gonadotropin-induced testicular maturation in male eel (*Anguilla japonica*). Biomed. Res. 12, 241-248.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1992. The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. J. Exp. Zool. 261, 359-363.

Miura, T., Kasugai, T., Nagahama, Y., Yamauchi, K., 1995. Acquisition of potential for sperm motility in vitro in Japanese eel (*Anguilla japonica*). Fisheries Sci. 61, 533.

Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K., Nagahama, Y., 1995a. Human recombinant activin induces proliferation of spermatogonia in vitro in the Japanese eel *Anguilla japonica*. Fisheries Sci. 63, 434-437.

Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K., Nagahama, Y., 1995b. Activin B is a major mediator of hormone-induced spermatogonial proliferation in the Japanese eel. In: Goets, F.W., Thomas, P. (Eds.), the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of the Fish., University of Texas, Austin, pp. 284-286.

Miura, T., Ohta, T., Miura, C., Yamauchi, K., 2003. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. Endocrinology 144, 5504-5510.

Miura, T., Higuchi, M., Ozaki, Y., Ohta, T., Miura, C., 2006. Progestin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenetic cells of the eel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 7333-7338.

Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M.R., Todo, T., Yamauchi, K., 1999. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. Biochem. Biophys. Res. Commun. 144, 5504-5510.

Morisawa, S., Morisawa, M., 1988. Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon. J. Exp. Biol. 136, 13-22.

Ohta, H., Ikeda, K., Izawa, T., 1997. Increase in concentrations of potassium and bicarbonate ions promote acquisition of motility in vitro by Japanese eel spermatozoa. J. Exp. Zool. 277, 171-180.

Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, 2007. Follicle-stimulate hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. Biol. Reprod. 77, 970-977.

Ozaki, Y., Higuchi, M., Miura, C., Yamaguchi, S., Tozawa, Y., Miura, T., 2006. Roles of 11 β -hydroxysteroid deheydrogenase in fish spermatogenesis. Endocrinology 147, 5139-5146.

Pinto, P.I.S., Teodosio, H.R., Galay-Borgos, M., Power, D.M., Sweeney, G.E., 2006. Identification of estrogen-responsive genes in the testis of sea bream (*Sparus auratus*) using supression subtractive hybridization. Mol. Reprod. Dev. 73, 318-329.

Pinto, E., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 1996. Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTHI and GTHII) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biol. Reprod. 54, 1375-1382.

Shimizu, A., Tanaka, H., Kagawa, H., 2003. Immunocytochemical applications of specific antisera raised against synthetic fragment peptides of mummichog GtH subunits: examinig seasonal variations of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in the mummichog and applications to other acanthopterygian fishes. Gen. Comp. Endocrinol. 132, 35-45.

Shiraishi, E., Yoshinaga, N., Miura, T., Yokoi, H., Wakamatsu, Y., Abe, S.-I., Kitano, T., 2008. Müllerian inhibiting substance is required for germ

cell proliferation during early gonadal differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). Endocrinology, in press.

Staton, C.A., Brown, N.J., Lewis, C.E., 2003. The role of fibrinogen and related fragments in tumour angiogenesis and metastasis. Expert. Opin. Biol. Ther. 3, 1105-1120.

Swanson, P., Dickey, J.T., Campbell, B., 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. Fish. Physiol. Biochem. 28, 53-59.

Swanson, P., Bernard, M., Nozaki, M., Suzuki, K., Kawauchi, H., Dickhoff, W.W., 1989. Gonadotropins I and II in juvenile coho salmon. Fish. Physiol. Biochem. 7, 169-176.

Ueda, H., Kanbegawa, A., Nagahama, Y., 1985. Involvement of gonadotropin and steroid hormones in spermiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, and goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol. 59, 24-30.

水研センター研報，第24号，123－128，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 123－128, 2008

報　文

魚類における雄性ホルモンの産生ならびに受容機構

玄浩一郎[*1]・奥　宏海[*2]・松原孝博[*3]

Molecular mechanism of androgen action in fish

Koichiro GEN[*1], Hiromi OKU[*2], Takahiro MATSUBARA[*3]

Abstract Androgens are pleiotropic hormones for expression of the male phenotype. They play pivotal roles during male sex differentiation, but also during the development of secondary male characteristics and during initiation and maintenance of spermatogenesis. The biological action of androgens is mediated through the androgen receptors (AR), which are ligand-inducible transcription factors. In teleost fishes, an understanding of the molecular mechanism underlying androgen action is important not only for basic science but also for aquaculture. In this article, recent progress in several aspects of androgen action in teleosts is reviewed ; namely, physiological roles, biosynthesis pathway, and structure and function of androgen receptor. Additionally, possible future directions of study are suggested.

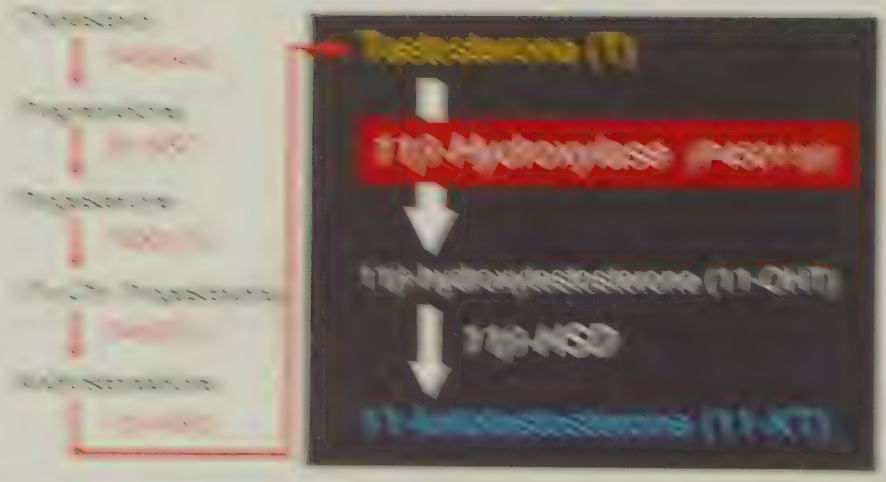
Key words : 11-ketotestosterone, androgen biosynthesis, androgen receptor, gonad

近年、BSEや鳥インフルエンザによる食肉への不安を背景とした世界的な魚食ブームの高まりや、国内における消費者ニーズの多様化によって、様々な魚種で増養殖が行われるようになった。このため、生産者レベルでは安定的・効率的な種苗生産技術の開発が強く求められている。しかし、多くの増養殖重要魚で生殖腺の発達や卵や精子の形成過程に関する知見が集積されたものの、技術開発を合理的に進めていく上で必要な「配偶子の形成制御機構」はあまり明らかにされていない。生殖腺で合成される雄性ホルモン（アンドロゲン）は、ステロイド骨格を有する脂溶性低分子で、精巣に直接作用し、精子形成や生殖腺の発達を強く支配する主要な成熟誘導因子である。この作用を媒介するのがアンドロゲン受容体であり、それ自身は転写因子として標的遺伝子の発現調節に直接関わるという特徴を持つ。このため、アンドロゲン受容体は、雄性ホルモンの作用機構や調節機構を理解するうえで極めて重要な因子であると考えられる。しかしながら、魚類ではアンドロゲン受容体の構造や作用機序についてはほとんど明らかにされていない。そこで本稿では、魚類の雄性ホルモンとその産生機構について概説した後、魚類で得られた知見を交えつつアンドロゲン受容体を介した雄性ホルモンの受容機構について紹介する。

魚類の雄性ホルモンとその産生機構

生殖腺でおもに合成される雄性ホルモン（アンドロゲン）は、脊椎動物全般で雄の配偶子形成、性分化、雄性生殖器の発達、第2次性徴等に深く関わっている。哺乳類では、精巣のライディヒ細胞で合成されたテストステロンが血流を介して標的細胞に到達し、細胞内で5α還元酵素によってジヒドロテストステロン（DHP）に変換されることで活性型の雄性ホルモンとして作用する。魚類でも、精巣でテストステロンや11-ケトテストステロン（11KT）等の雄性ホルモンが

2008年4月23日　受理（Received on April 23, 2008）
[*1] 独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所玉城庁舎　〒519-0423　三重県度会郡玉城町昼田224-1
(National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, 224-1 Hiruta, Tamaki, Mie 519-0423, JAPAN)
[*2] 独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所　〒516-0193　三重県度会郡南伊勢町中津浜422-1
(National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, 224-1 Nakatsuhamaura, Minami-ise, Mie 519-0193, JAPAN)
[*3] 独立行政法人水産総合研究センター北海道区水産研究所　〒085-0802 北海道釧路市桂恋116　(Hokkaido National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, 116, Katsurakoi, Kushiro, Hokkaido 085-0802, JAPAN)


Testosterone (T)
11β-Hydroxylase reaction
11β-hydroxytestosterone (11-OHT)
11β-HSD

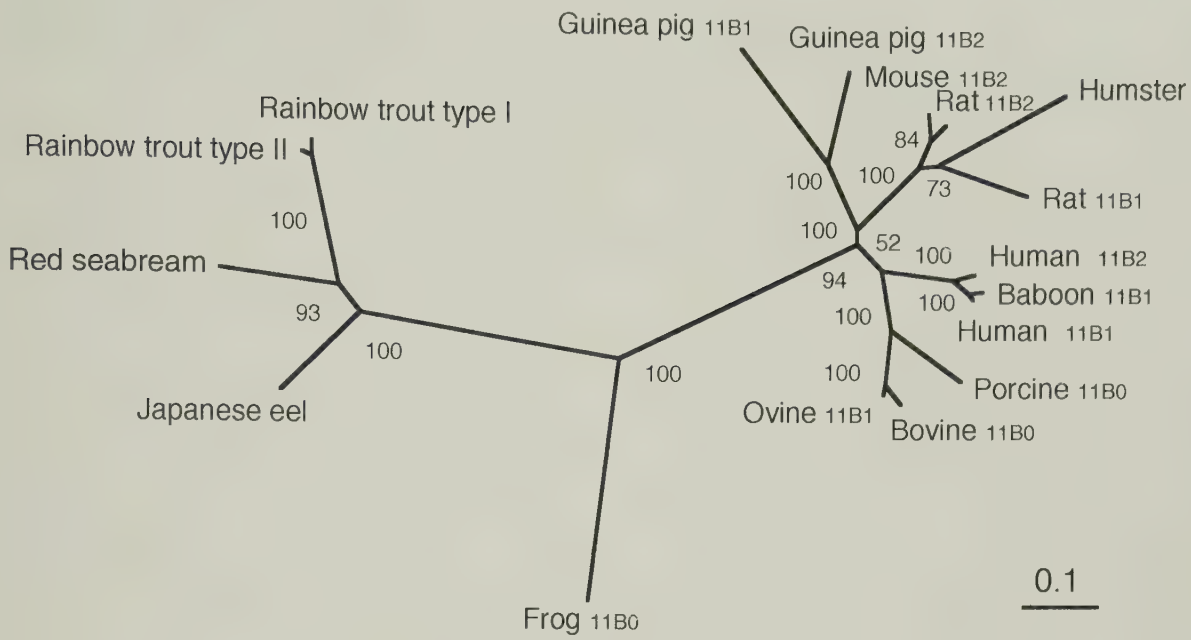


Figure .2. Phylogenic tree of vertebrate P45011 β proteins. The unrooted phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Joining method after alignment of deduced amino acid sequences of P45011 β protein. The scale bar indicates an evolutionary distance of 0.1 amino acid substitution per position in the sequence.

雄性ホルモンの受容機構

(1) アンドロゲン受容体の構造

アンドロゲン受容体を含むステロイドホルモン受容体、コルチコイド受容体ならびにミネラルコルチコイド受容体は、核内受容体とも呼ばれ、細胞質内あるいは核内に存在する分子量が約 50 ～ 150K ダルトンのタンパク質分子である。これらは、それ自身のホルモンに対して高い親和性（解離定数 :$1x10^{-9}$ ～ 10^{-10}M）を示すが、1 次構造の解析等によって共通の構造と機能を持つ遺伝子スーパーファミリーを形成していることがわかっている（Mangelsdorf *et al.*, 1995）。アンドロゲン受容体は、1988 年にヒトで初めて報告され以来、様々な生物で cDNA やゲノム構造の単離・同定がなされ、これまでのところ四肢動物では 1 種類しか存在しないことがわかっている。他方、魚類では、生化学的解析によって異なる属性をもつ 2 種類のアンドロゲン受容体の存在が示唆されていたが、ニホンウナギでの新規アンドロゲン受容体 cDNA の単離を契機に、2 種類の分子の構造が次第に明らかになってきた（Ikeuchi *et al.*, 1999）。これまでに、マダイでは 1 種類のアンドロゲン受容体（AR β）しか単離されていなかったが、筆者らの解析で 2 種類の受容体の存在が確認されており、多くの魚種でアンドロゲン受容体に 2 元性がある事はほぼ間違いなさそうである（図 3a）。魚類では、進化の過程で全ゲノムの重複が起こり、全ての遺伝子が倍加したことが明らかになっているが、ウナギやマダイでみられる 2 種類のアンドロゲン受容体遺伝子（AR α ならびに AR β）はその結果によるものと考えられている。他方、ニジマスでは、両者の相同性が極めて高く、分子系統樹解析の結果、同じ遺伝子クラスターに分類されることから、サケ科魚類特有の 4 倍体起源由来だと思われる（図 3b）。

多くの核内受容体が持つように、アンドロゲン受容体も複数の機能ドメインから構成されている。すなわち、N 末端には転写活性化ドメイン（A/B ドメイン）、中央部分には DNA 結合ドメイン（C ドメイン）、核内移行シグナルが存在する D ドメイン、さらに C 末端側にはリガンド結合ドメイン（E/F ドメイン）の 6 つの機能ドメインである（図 3a）。このうち、DNA 結合ドメインとリガンド結合ドメインは、アンドロゲン受容体において非常に重要な領域であるため、マダイを含む魚類から哺乳類までそのドメイン構造（アミノ酸配列）は高度に保存されている。DNA 結合ドメインの中には、機能的にも構造的にも異なる 2 つのジンクフィンガー領域（C I ならびに C II）が存在し、C I 領域が結合する DNA 配列を認識するとされている。また、その結合配列は、雄性ホルモン応答配列（ARE:androgen-responsive element）と呼ばれる GGTACANNNTGTTCT のパリンドローム型構造からなり、一般に雄性ホルモンによって発現が制御される遺伝子群に見いだされることが多い。哺乳類では、雄

性ホルモン自身がアンドロゲン受容体の発現に抑制的に作用することが知られている。しかし、これまでのところ、受容体遺伝子の発現領域にはAREは見いだされておらず間接的な関与の可能性が示唆されている。他方、筆者らのマダイ精巣片を用いた培養実験では、雄性ホルモンによって受容体の発現が増加することが観察されており、今後、両受容体遺伝子の発現領域等の解析が期待される。

アンドロゲン受容体を含む多くの核内受容体の立体構造の解析から、雄性ホルモンが結合するリガンド結合ドメインは12個のα－ヘリックスから構成され、それらがリガンドを捕らえるポケットを形成することがわかっている。さらに、この領域には遺伝子の発現を制御する転写活性化ドメインも重複して存在することが明らかとなっている。後述するように、アンドロゲン受容体を介した遺伝子の発現制御には、受容体と共役因子（co-factor）の結合が不可欠であるが、両者の相互作用には転写活性化ドメインとリガンド結合ドメインが深く関わっている。2つのドメイン内には、それぞれAF-1ならびにAF-2と呼ばれる領域が存在し、雄性ホルモンのある/なしでその機能が異なる。すなわち、雄性ホルモンが結合していない状態では、リガンド結合ドメインはAF-1活性を抑制しているが、雄性ホルモンの結合によってAF-2活性が誘導されると同時に、アンドロゲン受容体の分子構造の変化によってAF-1活性の抑制の解除が起こり、遺伝子発現の活性化が誘導されるようである。魚類では、一般に2種類のアンドロゲン受容体の転写活性ドメイン（A/Bドメイン）は相同性が低いことがわかっている（図3a）。また、魚類ARαの転写活性化ドメインは四肢動物のものと相同性が高い（約80%）のに対して、ARβは極めて相同性が低い（約20%）という特徴をもつ。このことから、両アンドロゲン受容体の遺伝子発現における作用機序の違い、特にARβを介した遺伝子の発現調節機構には興味が持たれるところである。

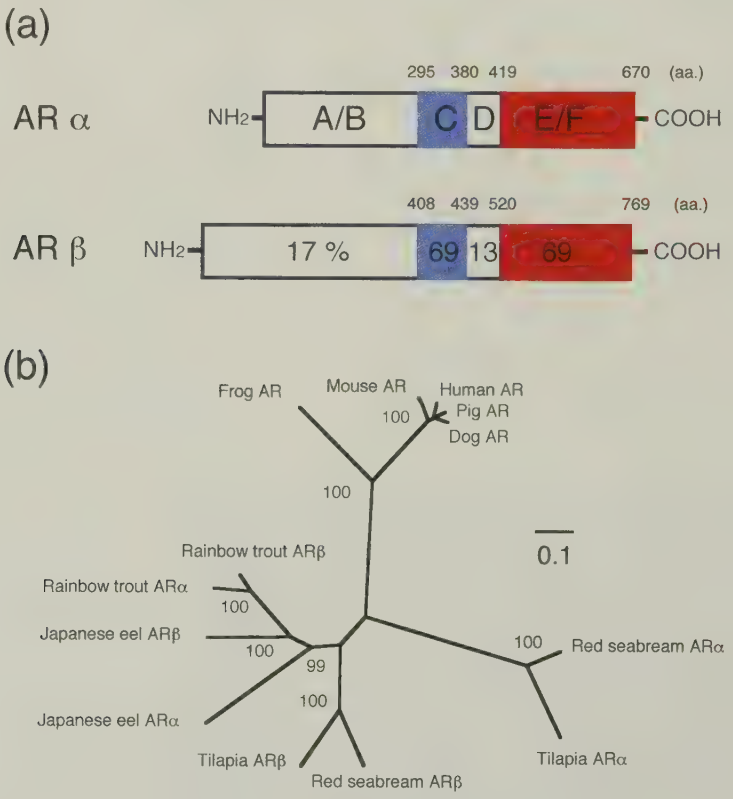


Figure .3. Functional domain structure of the red seabream androgen receptors.
a) Comparison of red seabream androgen receptor α (AR α) and β (AR β) predicted protein sequence. The protein consists of several distinct functional domains: transcription activation functions (A/B domain), a nuclear localization signal (D domain), the DNA-binding domain (C domain) and ligand binding domain (E/F domain).
b) Phylogenic analysis of vertebrate androgen receptor proteins. Sequences were aligned by the CLUSTAL W software, whereas the phylogenetic tree was constructed with Neighbor-Joining method. The scale bar indicates an evolutionary distance of 0.1 amino acid substitution per position in the sequence.

(2) アンドロゲン受容体の作用機序

細胞質で雄性ホルモンと結合したアンドロゲン受容体は、それまで結合していたシャペロン分子（Hsp 70など）から遊離し2量体の形成を行う。この雄性ホルモン－アンドロゲン受容体複合体が核内に移行し、DNA上の雄性ホルモン応答配列（ARE）に結合する。AREに結合したアンドロゲン受容体は共役因子群（SRC1/NcoA1、N-CoR/SMART等）を介することで最終的に標的遺伝子の発現を活性化したり抑制化したりする（図4）。このため、共役因子の結合はアンドロゲン受容体の機能発現に重要な役割を果たすと考えられている（Heinlein and Chang, 2002）。近年、核内受容体のリガンド結合部位のX線結晶構造解析から、その詳細なメカニズムが明らかにされている。すなわち、リガンド結合ドメインの中央に位置している疎水性のリガンド結合ポケットにホルモンが結合すると、12個のα－ヘリックスのうち最もC末側にあるヘリックス12が大きく移動することで、立体構造が変化し、それに引き続く分子内の構造変化によって、受容体表面にヘリックス3～5からなる疎水性の溝の形成ならびに共役因子の結合がおこり、最終的に遺伝子の発現が誘導される（Shiau *et al.*, 1998）。このように哺乳類では、アンドロゲン受容体の遺伝子発現における詳細なメカニズムが明らかにされているが、魚類におけるアンドロゲン受容体の作用機構はほとんど不明である。培養細胞を用いたレポーターアッセイによって、ウナギの2種類のアンドロゲン受容体は、テストステロンの転写活性は極めて低いものの、11KTならびに哺乳類の活性型テストステロン（DHT）は同等の転写活性を持つことがわかっている（Ikeuchi *et al.*, 1999）。また、マダイAR βではテストステロンと11KTの両者による転写の活性化が報告されている。他方、ニジマスから単離された2種類の受容体のうち1つが機能的な分子（AR α）であり、11KT、テストステロンならびにDHTの主要な雄性ホルモンで転写の活性化が起こる。しかし、いずれの場合においても、雄性ホルモンの添加によるレポーター遺伝子の転写活性化の有無をみているので、転写活性化ドメインやリガンド結合ドメインの個々の機能特性については依然として不明である。

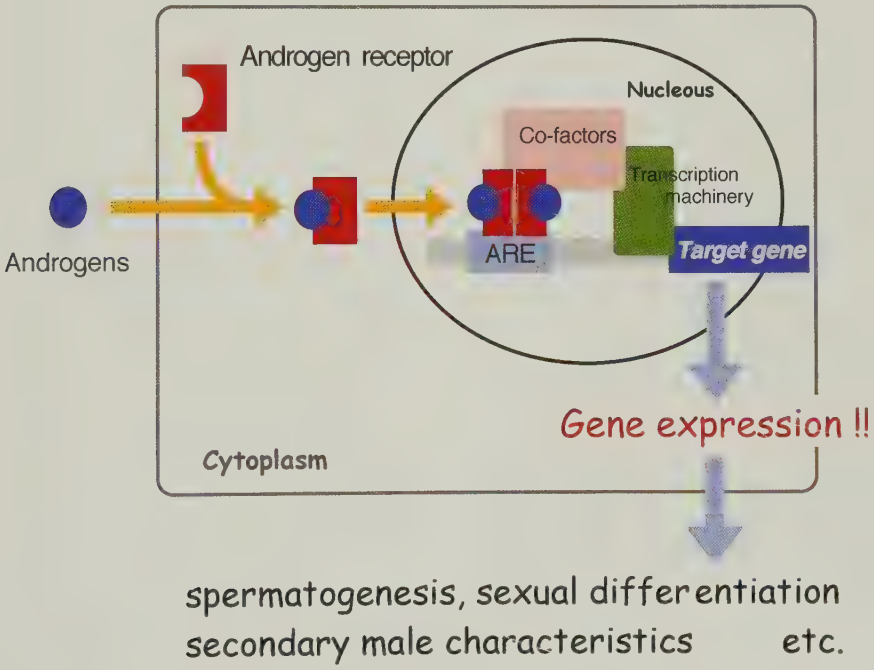


Figure .4. Molecular mechanisms of androgen-androgen receptor action. Androgens bind to androgen receptor (AR) and promote the association of co-factors. Then androgen-AR translocates to the nucleus and binds to androgen-responsive element (ARE) in the promoter region of target genes to induce transcription.

おわりに

雄性ホルモンは精子形成や雄性生殖器の発達のみならず、雄の性分化を強く支配するため、アユ等の養殖対象魚種の全雄化処理に用いられている。しかし、これまでの筆者らの解析等から投与した雄性ホルモンは生殖腺のみならず、他臓器における遺伝子発現にも影響を及ぼしていることが明らかとなっている(Yamaguchi *et al*., 2005)。さらに、消費者の「安全・安心」への関心の高まりを考えあわせると、組織特異的な作用をもつ非ステロイド型誘導因子の開発が急務であると考えられる。近年、創薬分野では、アンドロゲン受容体を介した選択的アンドロゲン受容体作動薬 (Selective Androgen Receptor Modulators : SARMs) の探索が精力的に行われている (Negro-Vilar, 1999)。SARMs は、アンドロゲン受容体との結合によって通常とは異なる構造変化を誘導し、それによって生理条件下では結合しない共役因子との相互作用を引き起こすことで、受容体を介した生理作用のうち有用な機能だけを発現させるという薬理学的な特徴をもつ。既に、哺乳類では S1 あるいは S4 といった組織によって雄性ホルモン作用が異なる SARMs が開発されており、臨床分野では新たな治療薬として脚光を浴びている。今後、水産の分野においても、SARMs が非常に有効な成熟誘導因子あるいは性転換誘導因子となりうることが大いに期待されるが、その探索や開発を合理的に進めて行く上で、魚類のアンドロゲン受容体の構造と機能に関する更なる知見の集積は必要不可欠である。

文 献

Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y, 1991: Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (Anguilla japonica). *Proc Natl Acad Sci U S A*., **88**, 5774-5778.

Endo T, Todo T, Lokman PM,, Ijiri S, Adachi S, Yamauchi K, 2007 : In vitro induction of oil droplet accumulation into previtellogenic oocytes of Japanese eel, *Anguilla japonica. Abstracts for 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, p256

Yamaguchi S, Gen K, Okuzawa K, Kumakura N, Matsuyama M, Kagawa H, 2005: Effects of 11-ketotestosterone and gonadotropin-releasing hormone on follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression in castrated and sham-operated male red seabream *Pagrus major*. *Fisheries Sci*., **71**, 1049-1058.

Kusakabe M, Nakamura I, Young G, 2003: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase complementary deoxyribonucleic acid in rainbow trout: cloning, sites of expression, and seasonal·changes in gonads. *Endocrinology*. **144**, 2534-2545.

Gen K, Okuzawa K, Senthilkumaran B, Tanaka H, Moriyama S, Kagawa H, 2000: Unique expression of gonadotropin-I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. *Biol Reprod*., 2000 : 63, 308-319.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM, 1995: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**, 835-839.

Ikeuchi T, Todo T, Kobayashi T, Nagahama Y, 1999: cDNA cloning of a novel androgen receptor subtype. J *Biol Chem*., **274**, 25205-25209.

Heinlein CA, Chang C, 2002: Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev*., **23**, 175-200.

Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, 1998: The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell,* **95**, 927-937.

Negro-Vilar A, 1999: Selective androgen receptor modulators (SARMs): a novel approach to androgen therapy for the new millennium. *J Clin Endocrinol Metab*., **84**, 3459-3462.

水研センター研報，第24号，129－134，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 129－134, 2008

報　文

ウニ生殖巣の分化と成熟の過程を探る

山野恵祐[*1]・東藤　孝[*2]・浦　和寛[*2]

Differentiation and maturation of sea urchin gonad

Keisuke YAMANO, Takashi TODO, and Kazuhiro Ura

Abstract The process of differentiation and maturation of sea urchin gonads were studied at the molecular levels with the aim of controlling gonadal maturation. To find germ cell-specific makers, genes for vasa, PL10 and nanos were cloned. RT-PCR and *in situ* hybridization demonstrated that vasa and nanos genes were specifically expressed in germ cells in both sexes. Then, expression levels of those genes during embryonic development were measured by real-time PCR. Transcripts for vasa were accumulated in unfertilized eggs as a maternal factor whereas the expression of nanos gene enhanced during embryonic development. An ovary cDNA library was screened to find genes expressed with a stage-specific manner during ovarian maturation by the combination of EST and microarray analyses. Further analysis by real-time PCR on selected 18 genes demonstrated that 15 genes increased in their expression levels in the ovary during oogenesis. These genes encoded a component of cortical granules, cell division controlling factor, growth factor, enzyme, sperm-activation factor, unknown products, etc. We discuss about perspectives on the control of sea urchin maturation in relation to our study.

Key words : sea urchin, gonad, differentiation, maturation, vasa, nanos.

近年のウニ類の漁獲量は一万数千トンを推移しており、北海道を中心とした北日本ではエゾバフンウニ（*Strogylocentrotus intermedius*）、キタムラサキウニ（*Strogylocentrotus nudus*）、九州を中心とした西日本ではアカウニ（*Pseudocentrotus depressus*）が主要な漁獲対象となっている。これらのウニの資源増大を図るため、種苗生産・放流も長年に渡って実施されている。ウニ類の漁業生産はもっぱら漁獲に依っており、一部、養殖が行われているケースもあるが、養殖による生産量は極めて少なく漁業統計には現れない程度に過ぎない。

食品としてのウニを見た場合、ウニは水産物の中でも特異な性質を有している。すなわちウニ類では生殖巣（卵巣及び精巣）だけが食される。また食用に適した生殖巣は、栄養物を生殖巣内に十分に蓄積しているが成熟期に入る前の未成熟な状態のものである。このため食品としての品質や歩留まりは成熟状態と密接に関連しており、良質の生殖巣を得られる時期、いわゆる旬は、種毎に限られた季節となる。

一方、ウニの生殖巣の発達や成熟の調節機構に関する知見は少なく、生殖巣がいつ頃どのようにして分化してくるのか、卵形成がどのような過程や制御のもと進行するのかなど、不明な点が多く残されている。生殖巣の分化・発達・成熟の過程や仕組みが解明されることで、性や成熟の人為管理を通じて食品としての質を高める技術開発が可能になると期待される。そこで本課題では、ウニの生殖巣の分化及び生殖巣の発達・成熟に関する研究を実施した。

ウニ生殖巣分化マーカー遺伝子の単離と発現解析

ウニ類の生殖巣分化機構については、稚ウニへの変

2008年4月23日受理（Received on April 23, 2008）
[*1]養殖研究所　〒516-0193　三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1 (National Research Institute of Aquaculture, 422-1, Nakatsuhamaura, Minami-ise, Mie 516-0193, Japan)
[*2]北海道大学大学院水産科学研究科　〒041-8611　北海道函館市港町3-1-1 (Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1 Minato, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan)

態後に起こる始原生殖細胞（PGC）や生殖巣原基の形成についての形態学的研究がなされているのみであり、受精前後から発生過程における生殖細胞系列の存在や動態に関する知見はほとんど無い。PGC や生殖巣原基が変態直後の後部体腔壁に形成されることから（Houk and Hinegardner, 1980）、将来、体腔形成を担う予定運命を持つ、16 細胞期に植物極側に生ずる小割球が、生殖細胞形成にも重要な役割を担っていると考えられているが（Ogawa, et al., 1999; Ransick, et al., 1996）、その証明は未だなされていない。このように、これまでウニ類における生殖細胞形成や生殖巣分化の機構に関する研究の進展が立ち後れてきたのは、生殖細胞系列を識別するマーカーが得られていなかったことが、大きな要因の一つとして考えられる。

そこで、多くの動物種で生殖細胞特異的に発現しており、生殖細胞系列の特異的マーカーとして使用されている vasa 遺伝子と nanos 遺伝子に着目し、エゾバフンウニから vasa および nanos 相同遺伝子をクローニングした。エゾバフンウニ精巣より、vasa 遺伝子については vasa および vasa と同じファミリーに属する PL10 の 2 種類の cDNA が、nanos 遺伝子については 1 種類の cDNA がそれぞれ得られた。これら遺伝子の発現が生殖細胞特異的であるか否かを調べるため、先ずエゾバフンウニの各体組織における各遺伝子の発現を RT-PCR 法により調べた。その結果、PL10 遺伝子は調べた全ての組織（卵巣、精巣、咽頭、食道、胃、腸など）で発現していたが、vasa と nanos 遺伝子の発現は卵巣と精巣に限局していた。

そこで次に、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、生殖巣における各遺伝子の発現細胞について組織学的に解析した（Fig. 1）。その結果、卵巣において、vasa と nanos 遺伝子は卵原細胞や未熟な卵母細胞で強い発現が認められたが、卵形成の進行とともに発現は弱まり、成熟した卵母細胞では発現は見られなかった。一方、PL10 遺伝子も卵原細胞や未熟な卵母細胞でのみ発現が強かったが、成熟した卵母細胞でも弱い発現が認められた。精巣での各遺伝子の発現は精原細胞や精母細胞などの生殖細胞にのみ認められたが、nanos 遺伝子の発現は極めて弱かった。

次いで、リアルタイム定量 PCR 法により胚発生過程に伴う各遺伝子発現量の変化を調べた。その結果、vasa と PL10 の遺伝子発現量は、未受精卵から受精卵にかけて最も高く、胚発生の進行とともに減少した。このように、未受精卵と初期の卵割期の胚で高い発現が見られたことから、これらが卵形成過程で合成され、卵内に母性 mRNA として蓄積されることが示唆される。一方、nanos 遺伝子の発現量は、未受精卵から胚発生の進行とともに増加し、胞胚で最も高値を示した

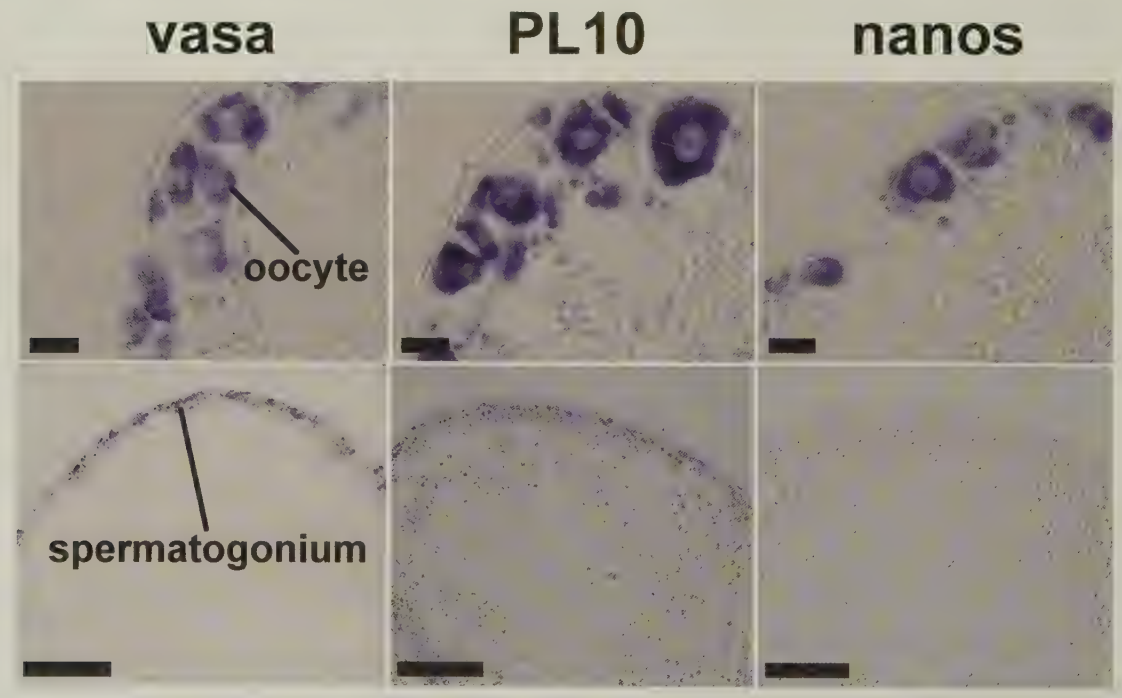


Fig .1. *In situ* hybridization of sea urchin ovary (upper figures) and testis (lower figures) at stage 2 (early gametogenesis) with antisense probes of vasa, PL10 and nanos cRNAs. Scale bars indicate 10 μm (ovary) and 50 μm (testis).

が、その後減少した。このように、受精卵で発現が見られたことから、nanos 遺伝子も量的に少ないとしても母性 mRNA として卵内に蓄積されているが、その発現パターンから、胚発生後に zygotic な発現が起こっていると考えられる。

以上の様に、vasa と nanos 遺伝子は生殖巣かつ生殖細胞特異的に発現していたことから、両遺伝子はエゾバフンウニの生殖細胞特異的マーカーとして利用できることが示された。そこで、ウニの生殖細胞を検出するうえでより汎用性の高いツールを得るため、ウニ Vasa タンパク質に対する特異抗体の作製を試みた。エゾバフンウニ vasa cDNA のアミノ酸配列より特異性の高い領域を選択し、大腸菌発現系を用いて組み換えタンパク質を作製した。これを家兎に免疫し、抗ウニ Vasa ポリクローナル抗体を得た。得られた抗体は、エゾバフンウニ生殖巣抽出液のウェスタンブロット解析において、卵巣と精巣ともに予想される分子量 80 kDa の一本のバンドのみを認識した。また、免疫組織化学では、卵原細胞や卵母細胞、精原細胞、精母細胞などの生殖細胞のみを認識することが確認された (Fig. 2)。さらに、キタムラサキウニでも同様の結果が得られたことから、作製された抗ウニ Vasa 抗体がウニ類一般の生殖細胞マーカーとして有用であることが示唆された。

ウニの生殖巣の成熟過程

Fig. 3 には Unuma, et al. (1996) に基づくアカウニの生殖巣の発達段階を示している。

Stage1（未熟期）：配偶子形成の始まる前の生殖巣である。雌雄とも生殖巣内は栄養細胞が卓越している。栄養細胞内には、将来、配偶子形成のエネルギー源として利用される、また卵黄タンパク質となる物質が蓄積されている。非常に強いエオシン好性を示す。配偶子は小嚢壁に沿って存在するが極めて小さく、少数である。この状態の生殖巣が食用として適している。

Stage2（成熟前期）：配偶子が発達し始める。雌では小嚢壁に沿って存在する卵母細胞が肥大し始める。この時期には卵細胞質内に多量の核酸を蓄積するためヘマトキシリン好性を示している。雄では小嚢壁に沿って精母細胞のクラスターが現れ、急激に細胞数を増加する。小嚢内は依然として栄養細胞が充満している。

Stage3（成熟中期）：発達した卵細胞や精子が小嚢壁から移動し、小嚢内の中央部に位置するようになる。移動中の卵細胞は大きな卵核を有するが、中央部の卵は卵核を持たない。卵内には卵黄タンパク質を蓄積し、卵径が増大するとともにエオシン好性となる。中間部には栄養細胞が存在する。

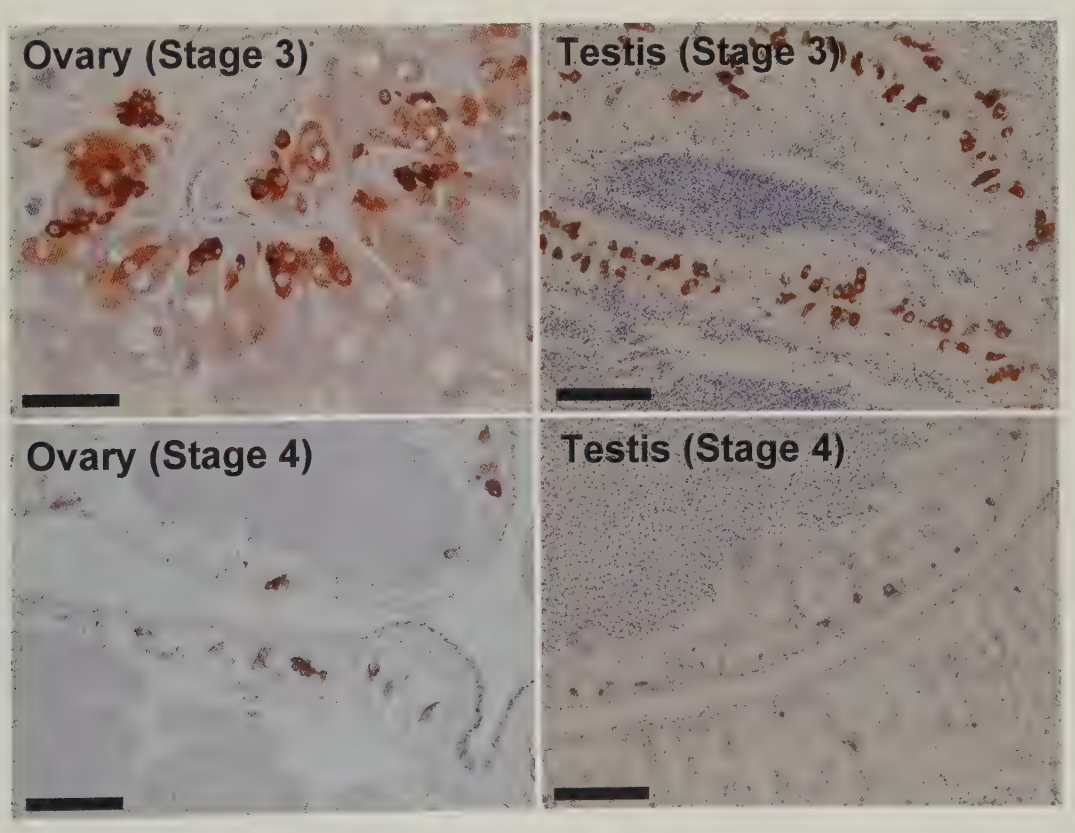


Fig .2. Anti-Vasa immunohistochemistry of sea urchin gonads. Scale bars indicate 50 μm.

Stage4（成熟後期）：小嚢内は成熟卵、精子で充満されている。栄養細胞はほとんど消失して周辺部に少し残るのみである。

ウニ類の生殖巣発達、特に卵巣発達には、他の卵生生物には見られない特徴がある。第一には、生殖巣の肥大が配偶子形成に先駆けて起こり、成熟期間中に生殖巣の増大は起こらない。これは、配偶子形成以前に体細胞である栄養細胞内に必要な栄養源を蓄積するためである

第二には、ウニ類では、順次、発達の進んだ卵から、卵核胞が崩壊した状態にまで進み、卵核胞を持たない完熟卵が産卵を待ち受けていることである。同じ棘皮動物のナマコ類、ヒトデ類なども含めて、他の卵生生物では、卵核胞を有する状態で卵発達は一旦停止し、産卵誘導の刺激を受けると一斉に卵核胞が崩壊して、引き続いて排卵、放卵に至る。ウニ類には、何らかの特殊な卵成熟調節の仕組みがあると推測される。

第三には、ウニ類の卵巣には濾胞細胞がない。多くの卵生生物では、卵を濾胞細胞が取り囲み、濾胞細胞が卵発達の調節に介在する。ウニ類では濾胞細胞がないことが特殊な卵発達過程と関係しているのかもしれない。卵を取り囲む栄養細胞が濾胞細胞の役割を持つのかもしれないが、その詳細は分かっていない。

ウニ卵巣発達に関連する遺伝子の探索

これまでのウニ卵巣あるいは卵の発達に関する分子レベルの研究では、主に卵黄や表層顆粒に関連した研究が実施されてきた。ウニ類の卵に最も多量に含まれる卵黄タンパク質は、主要卵黄タンパク質（MYP）と名付けられているタンパク質である。MYP は主に消化管、生殖巣で作られて、雌雄ともに未熟な生殖巣内の栄養細胞に蓄積される（Shyu, et al., 1986）。雌では一部が卵へと移行して、卵黄タンパク質になる。また、表層顆粒の形成過程や受精後に卵外に放出されたあとに表層顆粒の構成成分が受精膜として再構築される機構も明らかにされている（Wong and Wessel, 2006）。

しかしながら、未熟期から成熟期に変わる時期、すなわち配偶子形成を始める時期に卵巣内で起こっていることについては、未だ十分に分かっていない。特に、配偶子形成を開始させる仕組みは全く不明のまま残されている。このようなことから、配偶子形成に重要な役割を持つ候補遺伝子として、また将来的には成熟調節因子を同定するための分子マーカーとして利用することを目指して、成熟初期に発現量が明瞭に上昇する遺伝子の探索に取り組んだ。

成熟初期のアカウニ卵巣 cDNA ライブラリから得た

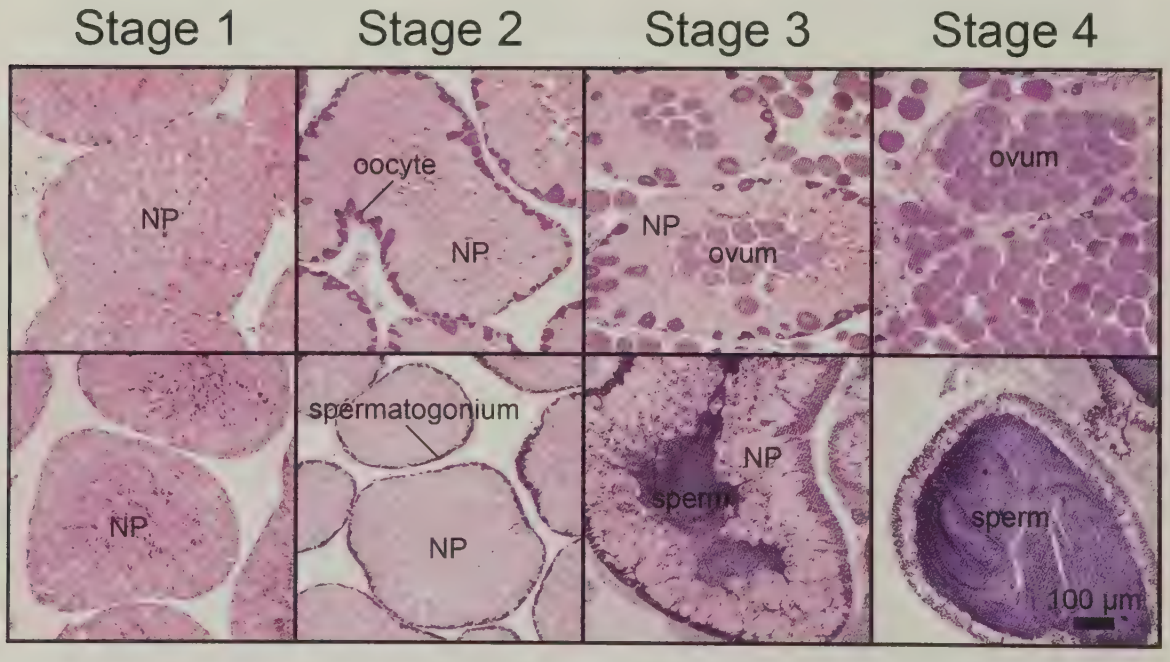


Fig .3. Histological sections of the ovary (upper figures) and testis (lower figures) at different maturational stages. Stage 1, immature; Stage 2, early gametogenesis; Stage 3, mid gametogenesis; Stage 4, late gametogenesis; NP, nutritive phagocyte.

960 個の EST（Expressed Sequence Tag、発現遺伝子の部分的な塩基配列情報）データを解析した結果、100 塩基以上の長さの独立した 869 種類の塩基配列情報を得た。この EST データを DNA データベースに照合したところ、約 70%が既報の塩基配列に対して有効な相同性（E 値< 1E-20）を示したが、残りは未知の塩基配列であった。また最も高い相同性を示すことが多かったのはアメリカムラサキウニ（*Strongylocentorotus purpuratus*）の登録配列であったが、これはアメリカムラサキウニの全ゲノムの塩基配列解析が行われたためである（Sea urchin genome sequencing consortium, 2006）。また、EST ライブラリーからのランダムな遺伝子解析と平行して、これまでの他種のウニ卵巣において発現していることが確かめられている透明層タンパク質、卵黄タンパク質などについても直接遺伝子クローニングを行った。

このようにして得られた成熟初期の卵巣で発現している遺伝子群から、配偶子形成の開始マーカーの候補遺伝子を次のように選択した。第一には、直接クローニングした遺伝子あるいは EST ライブラリからクローニングした遺伝子から卵発達と関連が深いと判断された YP30（30kDa 卵黄蛋白質）及び dynamin（MYP リセプター）遺伝子を解析対象とした。第二には、EST ライブラリから塩基配列解析した 960 個の卵巣発現遺伝子をスライドグラス上に整列して吸着させた cDNA マイクロアレイを作製し、それを用いて成熟に伴う遺伝子群の発現の変化の概要を解析した。その結果から、成熟初期に発現量の上昇した 16 遺伝子を候補遺伝子として選んだ。

次いでこれら合計 18 遺伝子について、より正確に遺伝子発現量を測定できるリアルタイム PCR 法を用いて、未熟期から成熟後期までの遺伝子発現量の変化を定量した。その結果、15 遺伝子は成熟期間中に遺伝子発現量が高まることが確認された。これらの遺伝子配列から推測される産物には、表層顆粒タンパク質、細胞分裂調節因子、成長因子、酵素、精子活性化因子、未知のものなどが含まれていた（table 1）。

ウニ類の成熟の人為コントロールに向けた展望

ウニ類は技術的には養殖できるが、実際の養殖生産量は極めて少ない。その主な原因は、天然物の漁獲と比較して、養殖が経済的に見合わないためである。食用に適したウニの生殖巣は、十分に栄養分を蓄積している未熟期のものである。このため天然ウニの旬の時期は限られる。旬の時期を長く保ち、端境期にも出荷できるような付加価値を持った産物を作ることができれば、養殖生産を促進するための一つの解決手段に成

Table1 List of genes highly expressed in the ovary during oogenesis

Homologus gene	Function in sea urchin oocytes	Fold induction*	Expression ratio** Female / Male
beta 1.3-glucanase	digestion of fertilization envelope	22.10	14.87
sperm-activating protein	activation of sperm mobility	10.44	61.44
fibropellin-1 precursor	component of hyaline layer	9.46	66.81
cyclin B	maturation promoting factor	8.40	9.55
dynamin	MYP receptor	6.08	no data
HeEL-1	component of hyaline layer	3.68	9.77
18kDa cortical vesicle protein	-	6.71	42.84
epidermal growth factor II precursor	-	17.63	42.14
fucosyltransferase 1 precursor	-	3.98	12.13
hypothetical protein XP_846215	-	4.81	31.41
hypothetical LOC752503	-	4.41	51.84
hypothetical LOC577181	-	38.47	57.88
unknown 1	-	6.07	46.08
unknown 2	-	4.95	9.36
unknown 3	-	4.01	24.61

*, Expression levels of each gene from stage 1 to 4 were measured by real time PCR, and normalized to the level of GAPDH. Fold induction was calculated as a ratio of the highest level during oogenesis (stage 1 - 3) to the level at immature stage (stage 1).

**, Expression levels were compared between both sexes by the microarray analysis, in which target genes were prepared from males and females at the stage 2.

りうるだろう。

旬の状態を長く保つためには、成熟の進行を遅らせる、あるいは成熟しないような管理手法が必要になる。これまでのところ、ウニ類の成熟をコントロールするホルモンなどの内的な因子は分かっていない。本研究では、成熟開始期に明瞭に遺伝子発現量が上昇する遺伝子を見出した。このような遺伝子をマーカーとして解析することで、成熟を調節する因子の特定を進めることが可能となる。成熟調節因子が特定されれば、どのような環境が成熟進行に影響を及ぼすかなどの解析を詳細に行うことができるようになる。さらには、成熟調節因子自体の機能を抑制することで未熟な状態を保つことができるかもしれない。

一方、近年の魚類等を用いた発生工学的な研究では、生殖巣の分化時に生殖細胞の分化に重要な働きを持つ遺伝子の発現を抑えることで、生殖細胞が欠除した生殖巣を作り出すことに成功している。本研究では、vasa や nanos 遺伝子が生殖細胞特異的に発現することを明らかにし、これらの遺伝子をマーカーとして生殖細胞の分化時期を明らかにした。これらの遺伝子の機能をノックダウンすることで、体細胞のみからなる成熟しない生殖巣を作り出すことができるかもしれない

ウニ類の生殖巣の分化、成熟機構に関する研究はまだ緒に就いたばかりである。成熟の人為管理に向けてさらなる研究の進展が望まれる。

文　献

Houk M S, Hinegardner R T, 1980: The formation and early differentiation of sea urchin gonads. *Biol. Bull.*, **159**, 280–294.

Ogawa M, Amikura R, Akasaka K, Kinoshita T, Kobayashi S, Shimada H, 1999: Asymmetrical distribution of mitochondrial rRNA into small micromeres of sea urchin embryos. *Zool. Sci.*, **16**, 445–451.

Ransick A, Cameron R A, Davidson E H, 1996: Postembryonic segregation of the germ line in sea urchins in relation to indirect development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6759–6763.

Sea urchin genome sequencing consortium, 2006: The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus, Science*, **314**, 941–952.

Shyu A B, Raff R A, Blumenthal T, 1986: Expression of the vitellogenin gene in female and male sea urchin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3865–3869.

Unuma T, Konishi K, Furuita H, Yamamoto T, Akiyama T, 1996: Seasonal changes in gonads of cultured and wild red sea urchin, *Pseudocentrotus depressus, Suisanzoushoku*, **44**, 169–175.

Wong J L, Wessel G M, 2006: Rendezvin: an essential gene encoding independent, differentially secreted egg proteins that organize the fertilization envelope proteome after self-association, *Mol. Biol. Cell*, **17**, 5241–5252.

水研センター研報，第24号，129－134，平成20年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 26. 129－134. 2008

報　文

クルマエビ卵巣のビテロジェニン遺伝子発現調節に働く細胞内シグナル伝達系の解明

奥村卓二*

Intracellular signaling pathways for vitellogenin synthesis in the ovary of the kuruma prawn, *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus*

Takuji OKUMURA

Abstract In penaeid shrimp species, vitellogenin (Vg) synthesis in the ovary is under the inhibitory regulation of vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) secreted from a neuroendocrine system, the X-organ/sinus gland complex in the eyestalks. In this manuscript, I review my work on intracellular signaling pathways for vitellogenin synthesis in the ovary of the kuruma prawn, *Penaeus* (*Marsupenaeus*) *japonicus*. The effects of pharmacological agents on Vg mRNA levels in incubated shrimp ovarian fragments indicate that cyclic nucleotides, Ca^{2+}, and protein kinase C are involved in the signaling pathways for vitellogenin synthesis in the ovary. Furthermore, previtellogenic ovaries showed larger inhibitory effects of pharmacological agents than vitellogenic ovaries. This result suggests that the responsiveness of signaling pathways for vitellogenin synthesis changes during ovarian development.

Key words : hormone, Kuruma prawn, signaling, vitellogenin

クルマエビなど甲殻類の種苗生産は，天然の成熟した親を漁獲して採卵したり，抱卵している親を漁獲してふ化幼生を得たりしている場合がほとんどである。そのため，漁獲の状況により，必要な時期に充分量の卵を確保できないことが問題になっている。この問題を解決するために，人為的に催熟して産卵させる技術開発が求められている。しかし，現時点で実用化されているのは眼柄除去による成熟・産卵促進だけであり，魚類で行われているようなホルモンを利用した成熟・産卵の促進技術はまだ実用化されていない。人為催熟にホルモンを利用するためには，まず成熟・産卵の調節機構を明らかにする必要がある。そこで，本プロジェクトに参加して2年間（平成18～19年度）課題を担当し，クルマエビを使って卵黄タンパク質前駆体（ビテロジェニン，vitellogenin）の合成調節機構を調べた。本稿でその概要を紹介する（詳細はOkumura 2006を参照）。

クルマエビでも他の卵生動物と同様に，受精後の胚発生時に必要な栄養を卵内に蓄える。卵内に蓄積される主要な栄養物質は卵黄タンパク質（ビテリン，vitellin）である。ビテリンは脂質や糖を含む大きなタンパク質（クルマエビでは分子量530 kDa，Kawazoe *et al.*, 2000）である。ビテリンの蓄積過程では，まず前駆体であるビテロジェニンとして卵巣と肝膵臓で合成された後，血リンパを介して卵母細胞に運ばれ，取り込まれたビテロジェニン分子が卵母細胞内で酵素分解をうけてビテリンが作られる。

甲殻類の眼柄を切除すると卵黄形成が進むことから，眼柄内の神経節にある内分泌器官（X器官－サイナス腺系）がホルモン（卵黄形成抑制ホルモン，vitellogenesis-inhibiting hormone, VIH）を分泌して卵黄形成を調節していると考えられている。クルマエビでも未熟エビから眼柄切除によりX器官－サイナス腺系を除去するとビテロジェニンの合成が誘導される（Tsutsui *et al.*, 2005a; Okumura *et al.*, 2006; Okumura 2007）。クルマエビのサイナス腺には7種類の血糖

2008年4月23日受理（Received on April 23, 2008）
*養殖研究所　〒516-0193　三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1 (National Research Institute of Aquaculture, 422-1, Nakatsuhamaura, Minami-ise, Mie 516-0193, Japan)

に昇ホルモン族ペプチドが存在し（Yang *et al.*, 1997; Nagasawa *et al.*, 1999），その中にはビテロジェニン合成を抑制するペプチド（卵黄形成抑制ホルモン）が含まれている（Tsutsui *et al.*, 2005b）。

一般にペプチドホルモンは，標的器官の細胞膜上の受容体に結合し，二次メッセンジャーなどの細胞内シグナル伝達系を介して作用する。甲殻類でも，血糖上昇ホルモン族ペプチドのひとつである脱皮抑制ホルモンで細胞内シグナル伝達系が調べられ，環状ヌクレオチドを二次メッセンジャーとしてタンパク質リン酸化酵素の活性化を介して作用していることが明らかにされている（Spaziani *et al.*, 1999）。さらに甲殻類の脱皮調節機構が調べられた結果，脱皮抑制ホルモンの血中量の変動だけでなく，標的器官（Y 器官）の側でもホルモン受動態の結合能と細胞内シグナル伝達系の感受性が変動してホルモンに対する反応性が変化し，脱皮周期が調節されていることが明らかになった（Chung and Webster, 2003）。卵黄形成抑制ホルモンも血糖上昇ホルモン族ペプチドに属するため，同様に血中ホルモン量の変動だけでなく，標的器官の側でもホルモンに対する反応性が変化してビテロジェニン合成が調節されている可能性がある。本研究では，卵巣のビテロジェニン合成調節に働く細胞内シグナル伝達系の感受性の変動と卵黄形成抑制ホルモン受容体候補について調べ，クルマエビのビテロジェニン合成調節機構の一端を明らかにした。

ビテロジェニン合成に働く細胞内シグナル伝達系の感受性変動

クルマエビの培養卵巣片内のビテロジェニン遺伝子発現を測定してホルモンの作用を調べる方法が確立されている（Tsutsui *et al.*, 2005b）。この方法を使い，細胞内シグナル伝達系に作用する薬剤を培養液に加えてビテロジェニン遺伝子発現の変化を調べた。その結果，環状ヌクレオチドであるサイクリック AMP（cAMP）とサイクリック GMP（cGMP）及びカルシウムイオンが二次メッセンジャーとして関与すること，さらにプロテインキナーゼ C によるタンパク質リン酸化が関与することを明らかにした（Fig. 1, Okumura 2006; 奥村　印刷中）。この研究は別のプロジェクト研究で行ったものであるが，本プロジェクト研究でさらに研究を発展させ，細胞内シグナル伝達系を未熟エビと成熟エビとで比較した。

クルマエビ卵巣小片の培養液にサイナス腺の粗抽出物を加えて 24 時間インキュベートした後，卵巣片内のビテロジェニン mRNA 量を測定した。サイナス腺の粗抽出物には卵黄形成抑制ホルモンが含まれているため，培養液に添加するとビテロジェニン mRNA 量を減少させる効果を持つことが知られている（Tsutsui *et al.*, 2005b）。未熟な雌エビからとりだした卵巣（前卵黄形成期，previtellogenic stage）では，サイナス腺抽出物の影響でビテロジェニン mRNA 量が 22% まで減少したが，眼柄を切除して卵黄形成を誘発した雌エビからとりだした卵巣（卵黄形成期，vitellogenic stage）では，サイナス腺抽出物添加による減少が 62% にとどまった（Fig. 2a, Okumura 2006）。この結果は，卵巣の卵黄形成抑制ホルモンに対する反応性が成熟状態によって変化することを示す。未熟な時期は卵黄形成抑制ホルモンによってビテロジェニン合成が抑制されているためホルモンに対する感受性が高いが，卵黄形成が始まるとホルモンによる抑制が必要でなくなるため感受性が低くなると考えられる。

続いて，細胞内の環状ヌクレオチドを増加させる薬剤 3 種類（cGMP の作動薬であるジブチル cGMP，cAMP の合成酵素を活性化する forskolin，cAMP と cGMP の分解を抑える IBMX）を添加してビテロジェニン遺伝子発現に対する影響を調べた。その結果，卵黄形成を始めた卵巣では発現抑制効果が弱くなることがわかった（Fig. 2b-d）。環状ヌクレオチドは二次メッセンジャーとしてタンパク質リン酸化酵素（プロテインキナーゼ A 及び G）の活性化を介してビテロジェニン遺伝子発現抑制に働いていると考えられているが（Fig. 1），こうしたシグナル伝達系の感受性も卵巣の成熟状態によって変化すると考えられる。

一方，二次メッセンジャーである細胞内カルシウムイオンを増加させる薬剤（calcium ionophore）とプロテインキナーゼ C 活性を高める薬剤（phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA）を添加した場合のビテロジェニン遺伝子発現に対する影響は，未熟な卵巣でも成熟を始めた卵巣でも発現抑制効果に大きな違いが見られなかった（Fig. 3）。カルシウムイオンとプロテインキナーゼ C もビテロジェニン遺伝子発現調節の細胞内シグナル伝達系に関与しているが（Fig. 1），これらの伝達経路の感受性は卵巣の成熟状態で大きく変化しないと考えられる。

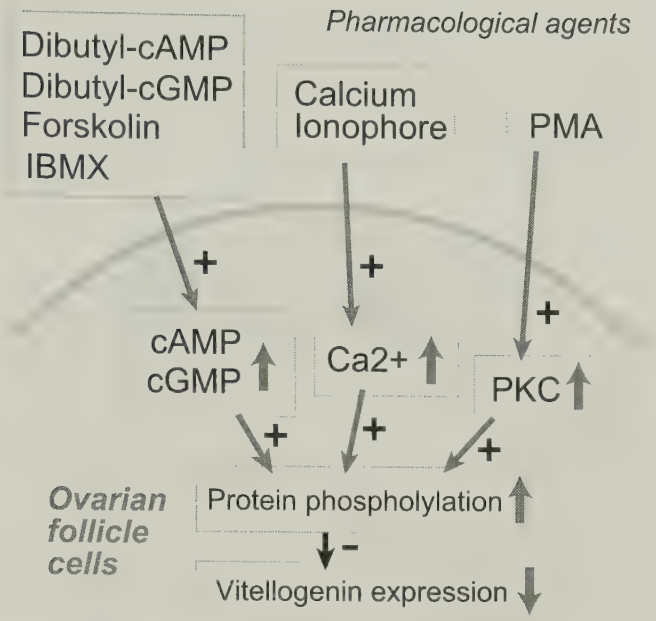


Fig. 1. Suppression of vitellogenin expression in ovarian follicle cells by pharmacological agents, dibutyl-cAMP (dibutyryladenosine 3',5' -cyclic monophosphate sodium salt, analog of cAMP), dibutyl-cGMP (dibutyrylguanosine 3',5' -cyclic monophosphate sodium salt, analog of cGMP), forskolin (activator of adenylate cyclase), IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, non-specific inhibitor of cAMP and cGMP phosphodiesterases), calcium ionophore (A23187), and PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, activator of protein kinase C). "+" and "-" indicate stimulatory effects and inhibitory effects, respectively. PKC: protein kinase C. (From Okumura in press)

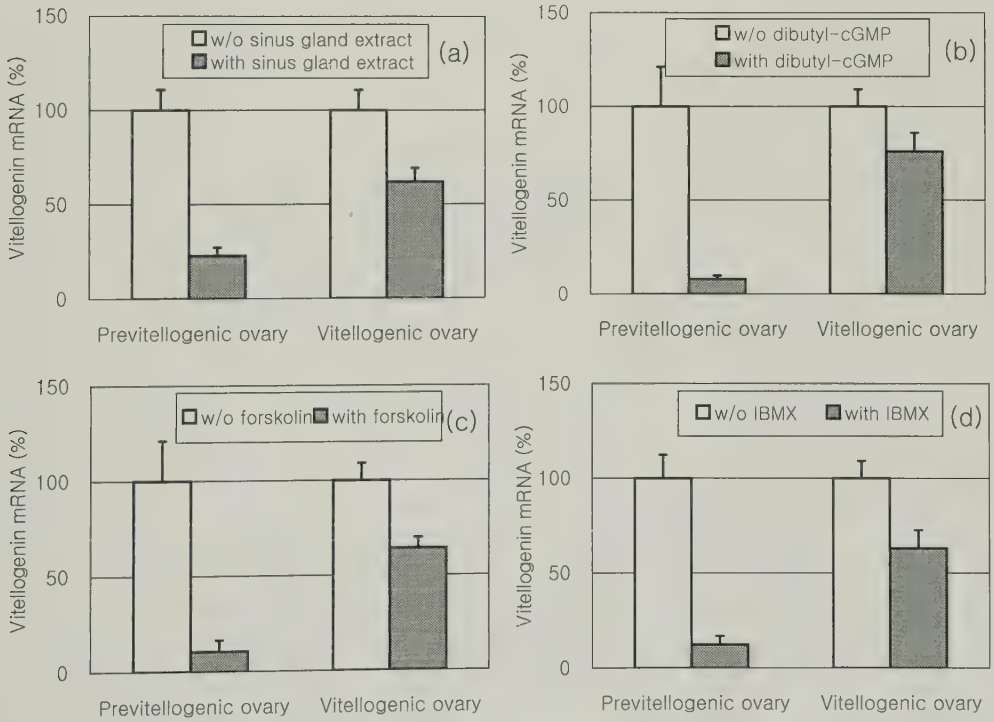


Fig. 2. Effects of (a) sinus gland extract (0.001 gland/mL), (b) dibutyl-cGMP (1 mM) (c) forskolin (0.1 mM), and (d) IBMX (1 mM) on vitellogenin mRNA levels in previtellogenic and vitellogenic ovarian fragments in 24 h incubations. Bars indicate the mean and SD of four samples.

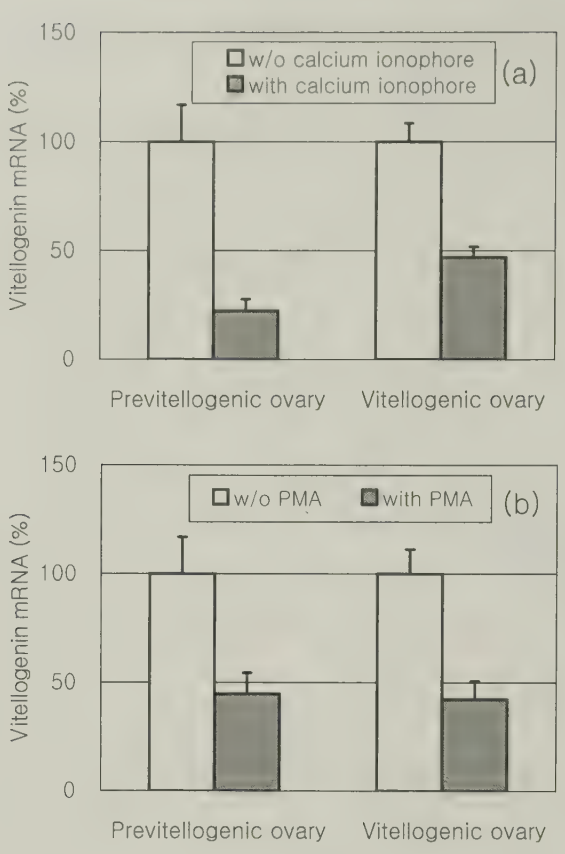


Fig. 3. Effects of (a) calcium ionophore (A23187, 0.001 mM) and (b) PMA (0.01 mM) on vitellogenin mRNA levels in previtellogenic and vitellogenic ovarian fragments in 24 h incubations. Bars indicate the mean and SD of four samples.

卵黄形成抑制ホルモンの受容体候補

一般にペプチドホルモンの作用の調節は，血中レベルの変動だけでなく受容体レベルの変動でも行われていることがある。甲殻類では，血糖上昇ホルモン族ペプチドのひとつである脱皮抑制ホルモンの受容体結合能が調べられている（Chung and Webster, 2003; Asazuma *et al.*, 2005）。ホルモン受容体の変動を詳しく調べるためには受容体タンパク質の精製や受容体遺伝子のクローニングが必要だが，まだ成功していない。しかし，ホルモンの作用にcGMPが関与していることから，グアニル酸シクラーゼ（guanylyl cyclase）がホルモン受容体の候補のひとつと考えられるようになった（Zheng *et al.*, 2006）。全く新規にホルモン受容体をクローニングすることは非常に困難で多くの労力と費用が必要になるが，グアニル酸シクラーゼなら甲殻類を含む多くの動物種でクローニングされており，その遺伝子配列情報を利用できるため，本研究課題でもクルマエビのグアニル酸シクラーゼをクローニングすることが可能と判断して取り組んだ。

グアニル酸シクラーゼは膜一回貫通型の膜タンパク質であり，リガンド結合部位，細胞膜貫通部位，キナーゼ部位，及びシクラーゼ部位のドメインを持つ1000～1500残基のタンパク質である。主なものとしてナトリウム利尿ペプチドホルモンの受容体がある。全体の構造の中でシクラーゼドメインの配列がよく保存されているため，この部位を利用してdegenerate PCRをおこなった。その結果，目的のサイズに近い240bpのバンドがクルマエビ卵巣cDNAから得られた。今後，この部分配列をもとにcDNA全長をクローニングし，発現部位や発現変動などの解析を行う予定である。

まとめ：ビテロジェニン合成調節機構

卵巣濾胞細胞におけるビテロジェニン遺伝子発現調節に働くシグナル伝達系をFigs. 4,5にまとめた。卵黄形成抑制ホルモンの刺激は二次メッセンジャーである環状ヌクレオチドの増加を引き起こし，cAMPとcGMP依存性のプロテインキナーゼ（PKAとPKG）の活性化を経てビテロジェニン遺伝子の発現を抑制する（Fig. 4）。このシグナル伝達系のホルモン刺激に対する感受性は卵巣の成熟状態によって変化すると考え

られる。さらに，カルシウムイオンとプロテインキナーゼCを介したシグナル伝達系も働いている（Fig. 5）。このシグナル伝達系は卵巣の成熟状態によって大きく変化しないようである。本研究により，卵巣濾胞細胞におけるビテロジェニン遺伝子発現調節に働くシグナル伝達系がより明らかになるとともに，シグナル伝達系の感受性の変化がビテロジェニン合成調節に関与していることが示された。現時点では，Figs. 4,5 に示したシグナル伝達系が卵黄形成抑制ホルモンの作用を伝える際に働くと仮定しているが，まだそれを直接証明する証拠は得られていない。現在，卵黄形成抑制ホルモンとシグナル伝達系の阻害剤を同時に卵巣片培養液に入れ，卵黄形成抑制ホルモンの作用を阻害する阻害剤を探索している。この研究が進むことで，卵黄形成抑制ホルモンのシグナル伝達系がより明確になる。

また，卵黄形成抑制ホルモンの受容体候補としてグアニル酸シクラーゼのクローニングを試みた。現時点では部分配列を決めようとする段階まできているが，全長の塩基配列を決めるのは今後の課題となっている。ペプチドホルモンの作用機構を解明するためには，受容体の解析が欠かせない。甲殻類の卵黄形成抑制ホルモンでも受容体の研究が進むことが期待される。

本研究では，卵巣のビテロジェニン合成が卵黄形成抑制ホルモンによって調節されていることを前提にして研究を進めた。これまでの研究により，甲殻類のビテロジェニン合成は抑制的に調節されていると考えられているが，昆虫や脊椎動物では主に促進的に調節されている。甲殻類だけが違うので，本当に促進ホルモンはないのか，という疑問がわいてくる。脊椎動物と同様にステロイドホルモンがビテロジェニン合成を促進するという報告もあるが，甲殻類の血中にはステロイドホルモンは微量しか検出されず，成熟状態と血中ステロイド量の関連を調べた限りでは実際に働いていないようである（Okumura and Sakiyama, 2004）。しかし，未知のホルモンが促進的に働いている可能性もあり，卵黄形成抑制ホルモンだけにとらわれず，新しいホルモンを探索する研究も今後必要だろう。

本研究は甲殻類の人為催熟技術の開発を目指して進められた。現段階で得られた研究成果では，眼柄切除による成熟促進に代わる新しい人為催熟技術を開発できるようになるまでまだ遠い。しかし，成熟調節機構の詳細が明らかになれば，ホルモンや薬剤の投与及びホルモンなどの遺伝子調節などによって人為的に成熟・産卵させて種苗を得る技術が開発されることが期待できる。クルマエビの種苗生産現場では，天然の成熟した親エビの漁獲状況によって種苗の生産時期や生産量が影響されている。効果的で簡便な人為催熟技術が開発されれば，現段階では未利用の未熟なエビを使って採卵し，種苗生産ができるようになる。そうなれば親エビ入手に悩まされることがなくなる。安定した種苗生産のために，今後も基礎研究を進めていく必要がある。

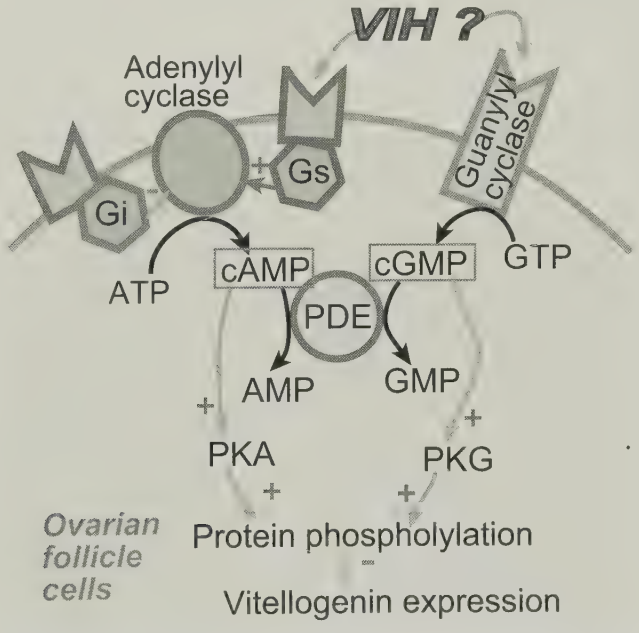


Fig. 4. Schematic diagram of signaling pathways for vitellogenin gene expression via cyclic nucleotides in the ovary. G, G protein; PDE, phosphodiesterase; PKA, protein kinase A; PKG, protein kainase G, VIH, vitellogenesis-inhibiting hormone. "+" and "−" indicate stimulatory effects and inhibitory effects, respectively.

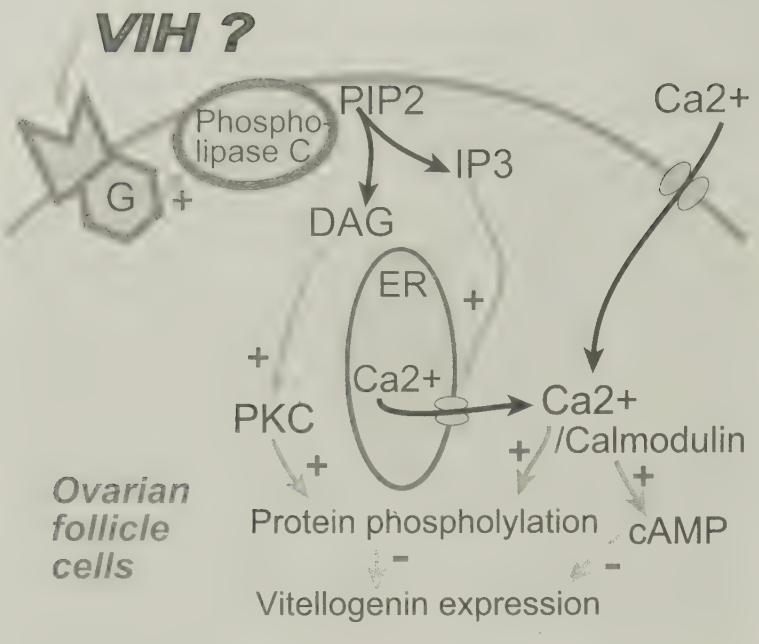


Fig. 5. Schematic diagram of signaling pathways for vitellogenin gene expression via calcium ion and protein kinase C (PKC) in the ovary. DAG, diacylglycerol; G, G protein; IP3, inositol 1,4,5-triphosphate; PIP2, phosphatidylinositol bisphosphate; VIH, vitellogenesis-inhibiting hormone. "+" and "−" indicate stimulatory effects and inhibitory effects, respectively.

文　献

Asazuma, H., Nagata, S., Katayama, H., Ohira, T., Nagasawa, H., 2005: Characterization of a molt-inhibiting hormone (MIH) receptor in the Y-organ of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1040**, 215-218.

Chung, J.S., Webster, S.G., 2003: Moult cycle-related changes in biological activity of moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 3280-3288.

Kawazoe, I., Jasmani, S., Shih, T.W., Suzuki, Y., Aida, K., 2000: Purification and characterization of vitellin from the ovary of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fisheries Sci.*, **66**, 390-396.

Nagasawa, H., Yang, W.J., Aida, K., Sonobe, H., 1999: Chemical and biological characterization of neuropeptides in the sinus glands of the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. in "Peptide Science - Present and Future" (ed. by Shimonishi, Y.), Kluwer Academic Publishers, London, pp. 453-454.

Okumura, T., 2006: Effects of cyclic nucleotides, calcium ionophore, and phorbol ester on vitellogenin mRNA levels in incubated ovarian fragments of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **148**, 245-251.

Okumura, T., 2007: Effects of bilateral and unilateral eyestalk ablation on vitellogenin synthesis in immature female kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Zool. Sci.*, **24**, 233-240.

奥村卓二，印刷中：クルマエビの卵黄タンパク質の調節機構とホルモンを利用した人為催熟技術の展望．水研センター研報．

Okumura, T., Kim, Y.K., Kawazoe, I., Yamano, K., Tsutsui, N., Aida, K., 2006: Expression of vitellogenin and cortical rod proteins during induced ovarian development by eyestalk ablation in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **143**, 246-253.

Okumura, T., Sakiyama, K., 2004: Hemolymph levels of vertebrate-type steroid hormones in female kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) during natural reproductive cycle and induced ovarian development by eyestalk ablation. *Fisheries Sci.*, **70**, 372-380.

Spaziani, E., Mattson, M.P., Wang, W.L., McDougall, H.E., 1999: Signaling pathways for ecdysteroid hormone synthesis in crustacean Y-organs. *Am. Zool.*, **39**, 496-512.

Tsutsui, N., Kim, Y.K., Jasmani, S., Ohira, T., Wilder, M.N., Aida, K., 2005a: The dynamics of vitellogenin gene expression differs between intact and eyestalk ablated kuruma prawn *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus*. *Fisheries Sci.*, **71**, 249-256.

Tsutsui, N., Katayama, H., Ohira, T., Nagasawa, H., Wilder, M.N., Aida, K., 2005b: The effects of crustacean hyperglycemic hormone-family peptides on vitellogenin gene expression in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **144**, 232-239.

Yang, W.J., Aida, K., Nagasawa, H., 1997: Amino acid sequences and activities of multiple hyperglycemic hormones from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Peptides*, **148**, 479-485.

Zheng, J., Lee, C.Y., Watson, R.D., 2006: Molecular cloning of a putative receptor guanylyl cyclase from Y-organs of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **146**, 329-336.

水産総合研究センター研究報告

Bulletin of Fisheries Research Agency

編集委員会

編集委員長　馬場徳寿

編 集 委 員　松尾　豊，武内智行，時村宗春，平井光行，川原重幸，高柳和史，
鈴木満平，北川大二，杜多　哲，野川秀樹，丸山敬悟，廣川純夫

平成20年12月31日　発行

発 行 所　独立行政法人　水産総合研究センター
〒220-6115　神奈川県横浜市西区みなとみらい2-3-3　クイーンズタワーB　15階
Fisheries Research Agency
Queen's Tower B 15F, 2-3-3, Minato mirai, Nishi-ku, Yokohama, Kanagawa.
220-6115 Japan
http://www.fra.affrc.go.jp

発 行 者　中前　明

印 刷 所　野崎印刷紙器株式会社

ISSN 1346-9894

BULLETIN OF
FISHERIES RESEARCH AGENCY

No. 26
December 2008

Bull.Fish.Res.Agen.

CONTENTS

Introduction

Development sub-team

Study of somite segmentation mechanism to determin abnormal spinal column development
Kazuo ARAKI and Hiroyuki OKAMOTO 1

The 'coupled-oscillators' in the zebrafish segmentation clock
Hiroyuki TAKEDA 9

The Molecular Mechanism of Stress-Induced Apoptosis in Fish Cells and Embryos: Activation of Neutral Sphingomyelinase-Ceramide Pathway
Takeshi YABU and Michiaki YAMASHITA 15

Observation of Stress-Induced Autophagy in Fish Cells
Takeshi YABU and Michiaki YAMASHITA 23

Autophagy-Mediated Yolk Absorption during Fish Embryogenesis
Shintaro IMAMURA, Takeshi YABU, and Michiaki YAMASHITA 29

Heat shock transcription factors: regulators of cellular stress response in fish
Nobuhiko OJIMA and Michiaki YAMASHITA 35

Molecular cloning of raldh2 from Takifugu rubripes
Susumu UJI, Tohru SUZUKI and Tadahide KUROKAWA 41

Physiological character sub-team

Expression and function of cytokine genes in the early development of fish
Yasutoshi YOSHIURA, Kanako ITO, and Mitsuru OTOTAKE 47

Appetite control systems in fish - Identification of fish leptin and agouti-family genes -
Tadahide Kurokawa 53

Molecular and cellular mechanisms of body lipid accumulation in fish
Hiromi OKU 63

Studies on Fish Muscle Tenderization and Improvement of Fish Meat Quality by Transgenic Technology
Haruhiko TOYOHARA 69

Physiological function of the insulin-related peptides in molluscs
Masahiko AWAJI and Shunsuke MORIYAMA 77

Screening of superior trait-related genes of torafugu by using the genome database
Shugo WATABE, Shigeharu KINOSHITA, Daisuke Ikeda, Satoshi Furukawa, Yuzuru SUZUKI, Kiyoshi KIKUCHI, and Wataru KAI 83

Repuroduction sub-team

Accumulation, degradation and utilization of yolk proteins in teleosts.
Takahiro MATSUBARA, Nobuyuki OHKUBO, Sayumi SAWAGUCHI, and Koichiro GEN 91

Germ cell transplantation in fish: A novel approach for conservation of genetic resources
Goro YOSHIZAKI 99

The mechanisms of gonadal sex determination and differentiation in fish
Tohru KOBAYASHI 107

Control mechanisms of fish spermatogenesis and early oogenesis by steroid hormones
Takeshi MIURA 115

Molecular mechanism of androgen action in fish
Koichiro GEN, Hiromi OKU, and Takahiro MATSUBARA 123

Differentiation and maturation of sea urchin gonad
Keisuke YAMANO, Takashi TODO, and Kazuhiro Ura 129

Intracellular signaling pathways for vitellogenin synthesis in the ovary of the kuruma prawn, Penaeus (Marsupenaeus) japonicus
Takuji OKUMURA 135